



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.25

(21) Номер заявки
201591832

(22) Дата подачи заявки
2014.03.18

(51) Int. Cl. **C12N 5/00** (2006.01)

(54) КОЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА VIII И ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА

(31) **1304973.9**

(32) **2013.03.19**

(33) **GB**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/GB2014/050850**

(87) **WO 2014/147386 2014.09.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОФАКТОР ФАРМА ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
**Маквей Джон Хендерсон, Гарнер Иэн,
Дейл Адель, Вернон Брюс (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SHOVLIN CLAIRE L. ET AL: "Endothelial cell processing and alternatively spliced transcripts of factor VIII: potential implications for coagulation cascades and pulmonary hypertension.", PLOS ONE 2010, vol. 5, no. 2, E9154, 2010, pages 1-9, XP002727998, ISSN: 1932-6203, abstract page 2, left-hand column, paragraph 3 - page 4, right-hand column, paragraph 1

WO-A2-2011060242

WARD NATALIE J. ET AL: "Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression", BLOOD, vol. 117, no. 3, January 2011 (2011-01), pages 798-807, XP055052195, abstract; figure 1 page 799, right-hand column, last paragraph - page 800, right-hand column, paragraph 2

McIntosh et al.: "Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant", Internet Blood, vol. 121, no. 17, 20 February 2013 (2013-02-20), pages 3335-3344, XP002727999, ISSN: 1528-0020, DOI: 10.1182/blood-2012-10-462200 Retrieved from the Internet:URL:http://www.bloodjournal.org/content/121/17/3335 [retrieved on 2014-07-29] page 3336, left-hand column, last paragraph - page 3337, left-hand column, paragraph 2 abstract; figures 1, 5

CHEN CHUN ET AL: "The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines", THROMBOSIS RESEARCH, vol. 95, no. 2, 15 July 1999 (1999-07-15), pages 105-115, XP002728000, ISSN: 0049-3848 abstract page 106, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2

PIPE S. W. ET AL: "Functional factor VIII made with von Willebrand factor at high levels in transgenic milk", JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 9, no. 11, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 2235-2242, XP002683522, WILEY INTERSCIENCE, ENGLAND ISSN: 1538-7836, DOI: 10.1111/J.1538-7836.2011.04505.X [retrieved on 2011-11-01] abstract page 2236, left-hand column, paragraph 4 - page 2237, left-hand column, paragraph 3

KAUFMAN RJ ET AL: "Effect of von Willebrand Factor coexpression on the synthesis and secretion of Factor VIII in Chinese Hamster Ovary Cells", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 9, no. 3, 1 January 1989 (1989-01-01), pages 1233-1242, XP002140918, ISSN: 0270-7306 the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к функциональной экспрессии рекомбинантного фактора VIII (rFVIII) в клетках и, конкретно, к его стабильной экспрессии и секреции из клеток *in vitro* и/или *in vivo* применениях.

Область техники

Настоящее изобретение относится к функциональной экспрессии рекомбинантного фактора VIII (rFVIII) в клетках и, конкретно, к его стабильной экспрессии и секреции из клеток *in vitro* и/или *in vivo* применениях.

Уровень техники

Фактор VIII (FVIII) представляет собой крупный сложный гликопротеин. Он синтезируется в виде 330кДа-белка с доменной структурой A1-A2-B-A3-C1-C2, где оба домена, A и C, обладают гомологией внутренней последовательности, которая составляет приблизительно 40% идентичности последовательности с доменами A и C фактора V. B-домен, который составляет 38% суммарной последовательности, не имеет идентичности последовательности с другими известными белками, включая B-домен фактора V. Однако он сильно гликозилирован и содержит 19 из 26 аспарагин (N)-связанных сайтов гликозилирования цельной молекулы.

По существу, понимание биосинтеза FVIII происходит из анализа экспрессии в гетерологичных типах клеток с целью получения rFVIII для терапевтических целей. Кроме того, характеристика молекулярных дефектов, отвечающих за аутосомно-рецессивное расстройство свертываемости, ассоциированное с объединенным дефицитом факторов V и VIII, обнаружила важность внутриклеточного транспорта в биосинтезе FVIII (1, 2).

Ранние исследования rFVIII продемонстрировали, что B-домен мог делетироваться без потери прокоагулянтной активности FVIII (рассмотрено в 3). Экспрессирующие кассеты, кодирующие rFVIII с делетированным B-доменом, приводили к получению значительно более высокого уровня мРНК по сравнению с экспрессирующей кассетой с полноразмерным rFVIII, которая приводила к более высокому уровню синтеза белка rFVIII. Однако уровень rFVIII, секретированного в среду, не повышался пропорционально, что предполагает внутриклеточные взаимодействия, лимитирующие эффективную секрецию (4). rFVIII посредством котрансляционной транслокации попадает в полость ЭР, где он сворачивается и собирается в третичную структуру. Эти реакции облегчаются ферментами и молекулярными шаперонами, которые взаимодействуют со сворачивающимися интермедиатами rFVIII.

In vivo, сразу после его секреции в кровоток, FVIII взаимодействует с образованием плотного нековалентного комплекса, который защищает его от преждевременного клиренса или от инактивации протеолизом. FVIII связывается с фактором фон виллебранда (VWF) через два сайта в доменах A3 и C2. *In vitro* было представлено, что добавление VWF к культуральной среде или коэкспрессия посредством котрансфекции с использованием VWF-экспрессирующих кассет клеток, экспрессирующих rFVIII, приводит к повышенному накоплению rFVIII в среде путем повышения стабильности rFVIII в культуральной среде (6). Предположили, что VWF стимулирует диссоциацию rFVIII с клеточной поверхности, а также может стимулировать сборку тяжелой и легкой цепи rFVIII в двухцепочечный гетеродимер (14, 15), однако, как предполагается, исключительно с образованием нековалентного комплекса с FVIII после того, как он оказывается вне клетки.

Делеция цельного B-домена, которая приводила к 17-кратному повышению мРНК и первичного продукта трансляции, приводила в результате к повышению только на 30% уровня секретированного белка, предполагая что степень транспорта ЭР-Гольджи уменьшилась и уровень мРНК FVIII не ограничивает экспрессию (4). Введение множества N-связанных сайтов гликозилирования, которые, как известно, важны для ЭР-Гольджи-транспорта FVIII, повышало уровень секретированного FVIII, предполагая что степень ЭР-Гольджи-транспорта может представлять собой лимитирующую стадию (7). Однако значительное количество FVIII внутри ЭР никогда не переходит в компартмент аппарата Гольджи благодаря нарушению корректной сборки, и накопление некорректно свернутого FVIII в ЭР может приводить к окислительному нарушению и к апоптозу (5), предполагая, что сборка FVIII представляет собой лимитирующую стадию в экспрессии FVIII.

В недавнем исследовании, которое было проведено для изучения эффекта экспрессирующих кассет FVIII, содержащих различные конструкторы B-доменов, изучали также эффект оптимизации по кодомам этих последовательностей для экспрессии в *Homo sapiens* (8). Человеческие эмбриональные почечные клетки (HEK293T) транзитивно трансдуцировали и оценивали экспрессию FVIII через 72 ч. Неожиданно выяснили, что никакого значительного эффекта от включения участков B-доменов не наблюдалось, однако наблюдали 7-30-кратное повышение функциональной экспрессии FVIII в результате последовательностей, оптимизированных по кодомам. Хотя вторичная структура белка определяется в основном по аминокислотной последовательности, сборка белка внутри клетки подвергается влиянию ряда факторов: которые включают взаимодействие с другими белками (шапероны) и лигандами, транслокацию через ЭР-мембрану и окислительно-восстановительные условия. Скорость транслокации также может влиять на сборку белка, и предположили, что использование кодонов может быть механизмом для регуляции скорости транслокации и, таким образом, дает возможность последовательной сборки индивидуальных белковых доменов (9, 10). FVIII представляет собой комплексный мультидоменный белок, в котором непоследовательные сегменты зарождающейся полипептидной цепи могут взаимодействовать в трехмерной структуре. Остановка рибосомы в "редких" кодомах может, таким образом, приводить к альтернативным путям сборки с получением измененных конформаций и потенциально некорректно собранно-

го белка. Потенциальное объяснение наблюдаемого эффекта оптимизированных по кодомам последовательностей может состоять в том, что они дают возможность эффективной трансляции и транспорта через ЭР-мембрану, что дает возможность зарождения полипептидной цепи FVIII для корректной сборки, которая приводит к повышенному уровню секретированного FVIII *in vitro* и *in vivo*.

Spencer et al. (16) раскрывают применение лентивирусной векторной платформы для экспрессии на очень высоком уровне рекомбинантного Фактора VIII, сконструированного с помощью биоинженерии. Однако это достигается путем создания химерной последовательности FVIII, которая включает 12% свиной последовательности, и такой FVIII не является фактически нативной или человеческой последовательностью. Это может вызывать регуляторные вопросы в отношении ее применения, поэтому это может быть не целесообразно, особенно в контексте человека.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение базируется на исследованиях, осуществленных авторами изобретения в отношении экспрессии rFVIII с делетированным В-доменом (BDD) rFVIII в клетках и, в особенности, rFVIII, оптимизированного по кодомам.

Изобретение базируется на работе, проведенной авторами настоящего изобретения по обеспечению высокопроизводительного получения вариантов млекопитающих, особенно человеческого FVIII, сконструированного для испытаний на животных и человеке, которые основаны на применении оптимизированных по кодомам химически синтезированных генов, которыми трансфицируют, например, клетки млекопитающего либо *in vitro*, либо *in vivo*.

Авторы изобретения наблюдали, что клетки млекопитающих, трансфицированные хомячьим рекомбинантным FVIII с делетированным В-доменом и который был оптимизирован по кодомам (BDDFVIII соор), не выживали в течение некоторого периода времени и что, таким образом, BDDFVIII соор не мог быть получен стабильно в приемлемых количествах. Однако с помощью коэкспрессии BDDFVIII соор вместе с хомячьим VWF с аналогичной оптимизацией кодонов можно было получить стабильно трансфицированные клетки, которые оставались жизнеспособными в течение значительного периода времени и в которых можно было наблюдать высокий уровень экспрессии BDDFVIII соор. Kaufman (6) предполагает, что коэкспрессия VWF вместе с rFVIII приводит к внеклеточной стабильности rFVIII, но при этом не было предположений о том, что коэкспрессия VWF вместе с BDDFVIII соор может помогать поддерживать клеточную жизнеспособность, а также функциональную жизнеспособность BDDFVIII соор.

В первом аспекте предлагается клетка млекопитающего, содержащая экзогенно введенную нуклеиновую кислоту, которая способна к рекомбинантной экспрессии FVIII, где нуклеиновая кислота или ее часть, которая кодирует указанный FVIII, была оптимизирована по кодомам для экспрессии с помощью клетки млекопитающего; и где клетка дополнительно коэкспрессирует Фактор фон Виллебранда (VWF).

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота, которая экспрессирует VWF, вводится в клетку млекопитающего перед нуклеиновой кислотой, которая способна к рекомбинантной экспрессии FVIII.

В предпочтительном воплощении полинуклеотидная последовательность VWF также может быть оптимизирована по кодомам аналогично последовательности FVIII. Таким образом, хотя остаток специфичности относится к оптимизации кодонов и конкретно к экспрессии FVIII, это не следует рассматривать как ограничение и может рассматриваться аналогично в отношении VWF.

FVIII млекопитающего, о котором идет речь, предпочтительно представляет собой человеческий FVIII, но также это может быть FVIII из другого примата или из другого млекопитающего, такого как мышь, крыса, хомяк, кролик, лошадь, корова, свинья, овца, верблюд, кошка, морская свинка или тому подобные. FVIII может представлять собой модифицированный вариант, известный в данной области, например вариант с делетированным В-доменом, BDD FVIII.

Клетка-хозяин млекопитающего может представлять собой любую клетку, подходящую для экспрессии оптимизированного по кодомам FVIII и может представлять собой, например, клетку с происхождением из человека, мыши, хомяка, крысы, обезьяны, кролика или собаки. Естественно, FVIII или его модифицированный вариант будет оптимизирован по кодомам так, как известно в данной области и как описано далее ниже, чтобы оптимизация кодонов подходила для экспрессии в выбранной клетке. Например, если клетка представляет собой клетку с происхождением из хомяка, то кодирующая последовательность нуклеиновой кислоты FVIII будет оптимизирована по кодомам для экспрессии в клетках хомяка. Клеточные линии, которые могут быть подходящими для экспрессии, включают HEK293, CHO, 3T3, BHK, MICK, Varo, Junket, Hela, а также производные таких клеток, известные в данной области.

Хотя нуклеиновая кислота может быть оптимизирована по кодомам для экспрессии в конкретной клетке млекопитающего, аминокислотная последовательность может соответствовать FVIII из того же или из других видов. В предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность FVIII соответствует последовательности человеческого FVIII или его фрагменту. Подходящие фрагменты человеческого FVIII или FVIII из других животных включают в предпочтительном воплощении последовательность FVIII, из которой был делетирован В-домен и необязательно заменен на короткий В-доменный спейсер, богатый аспарагин-связанными олигосахаридами. Предпочтительная аминокислотная последовательность FVIII с делетированным В-доменом представлена на фиг. 1. Такая последовательность с оп-

тимизированными кодонами для экспрессии в клетках хомяка, таких как клетки СНО или ВНК, представлена на фиг. 2.

В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагается или применяется выделенный полинуклеотид, содержащий фрагмент нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или на 99% идентичный последовательности, представленной на фиг. 2, и где фрагмент нуклеиновой кислоты кодирует или является вариантом оптимизированного по кодонам FVIII, такого как человеческий FVIII, представленный фиг. 1. Человеческая кодирующая последовательность с оптимизированными кодонами может быть оптимизирована с помощью методов, описанных в данном документе.

Как правило, нуклеиновая кислота конструируется внутри экспрессирующего вектора, который способен экспрессировать указанный рекомбинантный FVIII при подходящих условиях.

Стандартно, оптимизированная по кодонам последовательность нуклеиновой кислоты может быть исходно синтезирована химическими способами, а не клонироваться и подвергаться мутагенезу с целью получения необходимой оптимизации кодонов. Согласно настоящему изобретению возможно получение больших количеств рекомбинантного FVIII млекопитающих и его вариантов, что до сих пор было не возможно с использованием ранее описанных методов. Как правило, способы настоящего изобретения могут давать выход белка, составляющий по меньшей мере 0,5 мг рекомбинантного FVIII (или его вариантов) на 1 литр культуральной среды, как например, по меньшей мере 1 мг, 5 мг, 10 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг или 500 мг на 1 литр культуральной среды. Таким образом, понятно, что, следуя способам настоящего изобретения при использовании ферментеров промышленного масштаба, возможно получение сотен миллиграммов или граммов или даже килограммов количества рекомбинантного FVIII и его вариантов. Также понятно, что, следуя способам настоящего изобретения, возможно достижение выхода белка с продуктивностью, которая соответствует или выше, чем продуктивность клеточных линий промышленного производства для FVIII (т.е. >0,05 пг/на клетку/в день. Для этого может или нет требоваться использование методов генной амплификации, таких как DHFR/метотрексат).

В следующем аспекте в настоящем изобретении предлагается клеточная культура, содержащая клетку млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, которая способна экспрессировать FVIII в количестве $\geq 0,1$ пг/на клетку/в день, как правило, $\geq 0,25$ пг/на клетку/в день.

Клеточная культура может рассматриваться как стабильная в том, что она содержит один или несколько из следующих признаков:

- 1) Клеточная культура содержит по меньшей мере 5×10^6 , 1×10^7 или 1×10^8 клеток на мл;
- 2) Жизнеспособность клеток составляет по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 97%; и
- 3) Жизнеспособность клеток поддерживается в течение по меньшей мере 2 недель, 3 недель или даже 4 недель.

В следующем аспекте предлагается способ получения рекомбинантного FVIII млекопитающих, включающий получение клетки, как описано в данном документе, культивирование указанной клетки в подходящей культуральной среде, так что клетка экспрессирует и секретирует FVIII в культуральную среду, где указанный секретированный FVIII образует комплекс или по другому ассоциирован с VWF. Предпочтительно, для способа настоящего изобретения в некоторых воплощениях могут не требоваться методы генной амплификации, такие как методы амплификации с использованием DHFR/метотрексата, известные в данной области (см., например, Kaufman (17)). Авторы изобретения наблюдали, что метотрексат на уровне до 0,5 мкМ может использоваться для повышения продуктивности рекомбинантного FVIII, но более высокий уровень, как оказалось, имеет вредный эффект, который не ожидался.

Способ, описанный выше, может дополнительно включать очистку указанных белков или комплекса из клетки и/или культуральной среды, в которой клетка растет. Очистка может, как правило, включать в себя использование хроматографических методов, таких как методы жидкостной экспресс-хроматографии белков или высоко-эффективной жидкостной хроматографии, известные в данной области. В последующей стадии очистки сырой материал может, например, загружаться на аффинную хроматографическую колонку на основе сефарозы или агарозы, содержащей аффинный лиганд для VWF или FVIII, такой как моноклональное антитело или пептидный лиганд. В предпочтительном воплощении антитело к VWF (CaptureSelect VWF; Life Technologies) или к FVIII (FVIIISelect; GE Healthcare) применяется с целью связывания с указанным FVIII и/или VWF и элюируется с помощью применения градиента соли (например, 1-1,5 M NaCl или CaCl₂) из множества колоночных объемов; в следующей стадии FVIII-содержащие фракции из предыдущих стадий могут быть загружены, например, на анионообменную и/или на ИС-колонку. Порядок таких стадий очистки может меняться для повышения выхода и/или чистоты rFVIII или его варианта.

Настоящее изобретение основано скорее не на стандартном генном клонировании и экспрессии, а на изначальном химическом синтезе ДНК-молекул с оптимизированными кодонами, кодирующих указанный FVIII (и его варианты), используя дизайн генов и методы синтеза, известные в данной области (например, Gene composer: программное обеспечение базы данных для дизайна белковых конструкторов, конструкции кодов, и для синтеза генов, см. Lorimer (18)). Аналогично, нуклеиновые кислоты с оптими-

зированными кодонами синтезируют *de novo* перед клонированием в подходящий экспрессирующий вектор. Стандартные методы сайт-направленного мутагенеза, известные в данной области, для осуществления оптимизации кодонов гена FVIII будут неосуществимы с точки зрения временных затрат, если не невозможны из-за высокого риска введения дополнительных мутационных вариаций в процессе требуемых повторных раундов сайт-направленного мутагенеза. Однако сайт-направленный мутагенез может использоваться после клонирования синтетического FVIII с оптимизированными кодонами с целью осуществления одной или комбинации сайт-специфичных мутаций в продукте.

Оптимизация кодонов проводится с целью повышения уровня экспрессии FVIII млекопитающих и его вариантов в целевом организме-хозяине или в типе клеток, таких как хомяк или клетки хомяка. Указанная оптимизация включает в себя одно или несколько из следующего: адаптацию смещения кодонов для соответствия выбранному организму-хозяину или фактическому типу клеток; избегание участков высокого (>80%) или низкого (<30%) содержания GC; минимизация любых потенциальных внутренних ТАТА-боксов, *chi*-сайтов и сайтов связывания с рибосомой; минимизация АТ-богатых или GC-богатых протяженных последовательностей, избегание повторов и вторичных структур РНК, минимизация любых (скрытых) сайтов сплайсинга - донорных и акцепторных; и гарантия того, что любые целевые сайты эндонуклеаз рестрикции присутствуют только на краю 5'- и 3'-концов нуклеиновой кислоты для облегчения клонирования. Предпочтительно, все из вышеперечисленных факторов принимают во внимание при оптимизации последовательности нуклеиновой кислоты. Специалист способен сделать такие модификации в отношении исходной последовательности FVIII на основе знаний из предыдущего уровня техники в том, что касается смещения кодонов выбранного организма-хозяина и других методов (например, Codon bias and heterologous protein expression. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshall J. Trends Biotechnol 2004 22:346-53). Некоторые компании, такие как (Regensburg, Germany), GeneScript (Piscataway, New Jersey, USA) и DNA2.0 (Menlo Park, California, USA) обеспечивают услугу по оптимизации и синтезу последовательностей нуклеиновых кислот, которые приспособлены для экспрессии в конкретном организме-хозяине.

Экспрессирующие векторы, применяемые в настоящем изобретении, включают векторы, полученные на основе хромосом, эписом и вирусов, например векторы, включающие бактериальные плазмиды, бактериофаги, дрожжевые эписомы, дрожжевые хромосомные элементы, вирусы, такие как бакуловирусы, паповавирусы, вирусы коровьей оспы, аденовирусы, вирусы оспы-дефтерита птиц, вирусы псевдобешенства и ретровирусы, и векторы, полученные на основе их комбинаций, такие как космиды и фагмиды.

Рекомбинантные экспрессирующие векторы могут вводиться в клетки-хозяева с использованием хорошо известных методов, таких как инфекция, трансдукция, трансфекция, трансфекция, электропорация и трансформация. Вектор может представлять собой, например, фаговый, плазмидный, вирусный или ретровирусный вектор. Ретровирусные векторы могут быть способными к репликации или дефектными по репликации. В последнем случае вирусное размножение, как правило, будет осуществляться только в комплементирующих клетках-хозяевах.

Нуклеиновая кислота, кодирующая FVIII, должна быть функционально связана с подходящим промотором. Подходящие эукариотические промоторы включают немедленно ранний промотор цитомегаловируса, промотор тимидин-киназы вируса простого герпеса, ранний и поздний промоторы SV40, промоторы ретровирусных длинных концевых повторов (LTR), такие как из вируса саркомы Рауса, и промоторы металлотионеина, такие как промотор мышинового металлотионеина-I. Также подходят синтетические промоторы.

Экспрессирующие конструкторы будут дополнительно содержать сайты для инициации транскрипции, терминирования и, в транскрибируемой области, сайт связывания с рибосомой для трансляции. Кодированная часть зрелых транскриптов, экспрессируемых конструкторами, будет включать иницирующий трансляцию триплет AUG в начале и кодон терминирования в соответствующем положении в конце транслируемой последовательности нуклеиновой кислоты. С использованием синтетических генов легко оптимизировать все из этих признаков вставки для максимизации уровня экспрессии гена и выхода рекомбинантного белка.

Как известно, экспрессирующие векторы будут предпочтительно включать по меньшей мере один маркер селекции. Такие маркеры включают, например, ген устойчивости к дегидрофолат редуктазе, или к неомицину, или к зеоцину для эукариотической клеточной культуры и, например гены устойчивости к тетрациклину или к ампициллину для культивирования в *E. coli* и в других бактериях.

Как известно, введение конструктора в клетку-хозяин может подвергаться воздействию кальций-фосфатной трансфекции, DEAE-декстран-опосредованной трансфекции, трансфекции, опосредованной катионным липидом, электропорации, трансдукции, инфекции или других методов. Такие методы описаны во множестве стандартных лабораторных руководств, таких как Davis LGG et al. (21).

Как известно, транскрипция ДНК, кодирующей полипептиды по настоящему изобретению, высшими эукариотами может повышаться путем вставки энхансерной последовательности в вектор. Энхансеры представляют собой *cis*-действующие элементы ДНК, обычно примерно от 10 примерно до 300 п.о., которые действуют для повышения транскрипционной активности промотора в данном типе клеток-хозяев.

Примеры энхансеров включают энхансер SV40, который находится в позднем сайте точки начала репликации на расстоянии 100-270 п.о., энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы в позднем сайте точки начала репликации и энхансеры аденовируса.

Из уровня техники известно, что последовательность аминокислотных остатков полипептида FVIII может селективно варьироваться, не вызывая значительного вредного эффекта в отношении структурной целостности функциональных свойств белка. Если предполагаются такие различия в последовательности, то следует помнить, что существуют области белка, которые являются критичными для его биологической активности. Кроме того, существуют остатки, которые критичны для сборки белка или для стабилизации его собранной структуры. Некоторые остатки служат в качестве сайтов гликозилирования, распознаваемых ферментами, которые ковалентно присоединяют гликаны, например, к аспарагину. Вообще, может быть возможно безопасно заменить остатки, которые вносят вклад прямо или косвенно в структуру или функцию с помощью других остатков, которые сходны по химической структуре (они известны как консервативные замены). В случае аминокислотных остатков, которые не вносят вклад ни в структурную целостность, ни в функциональные сайты, может быть возможно безопасно заменить такой остаток на аминокислотный остаток другой химической природы (неконсервативная замена).

Как правило, видно, что консервативные замены представляют собой замены одну на другую алифатических аминокислот Ala, Val, Leu и Ile; внутренние замены между гидроксильными остатками Ser и Thr; обмен кислотных остатков Asp и Glu; замена между аминокислотными остатками Asn и Gln; обмен между основными остатками Lys и Arg; и замены среди ароматических остатков Phe и Tyr. Неконсервативные замены могут включать замены как на природные кодируемые аминокислотные остатки, так и на синтетические кодируемые (не природные) аминокислотные остатки. Не природные аминокислотные остатки могут быть такими, которые служат в качестве сайт-специфичных сайтов присоединения для конъюгации с химическими компонентами (такими как полиэтиленгликоли (PEG) и другие полимеры), или с биохимическими группами (такими как гликаны), которые усиливают терапевтическую эффективность FVIII.

Как подробно указано выше, дополнительное руководство, касающееся каждой аминокислотной замены, вероятно являющийся фенотипически молчащей (т.е. вероятно не имеет значительных побочных эффектов в отношении функции), можно обнаружить в Bowie (19)

Термины "нуклеиновая кислота" или "фрагмент нуклеиновой кислоты" относятся к одному или нескольким сегментам нуклеиновой кислоты, например ДНК- или РНК-фрагментам, присутствующим в полинуклеотиде или в конструкте. В то время как термин "нуклеиновая кислота", при использовании в данном документе, как подразумевается, включает любую нуклеиновую кислоту сконструированного или синтетического кодирующего участка с оптимизированными кодонами, который кодирует полипептид, или его фрагмента, варианта или производного, который был оптимизирован соответственно применению кодонов в данном виде или типе клеток. При использовании в данном документе "кодирующий участок" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, может предполагаться, что он может быть частью кодирующего участка, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания с рибосомой, терминаторы транскрипции и тому подобные, не являются частью кодирующего участка. Две или более нуклеиновые кислоты или фрагменты нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут присутствовать в одном полинуклеотидном конструкте, например, на одной плазмиде или в отдельных полинуклеотидных конструктах, например на отдельных плаزمиде. Кроме того, нуклеиновая кислота или фрагмент нуклеиновой кислоты может кодировать один полипептид или может кодировать более чем один полипептид, например нуклеиновая кислота может кодировать два или более полипептида. Кроме того, нуклеиновая кислота может кодировать регуляторный элемент, такой как промотор или терминатор транскрипции, или может кодировать гетерологичные кодирующие участки, например специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или функциональный домен.

Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" в отношении FVIII-полипептидов по настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют функциональную биологическую активность соответствующего нативного полипептида. Фрагменты FVIII-полипептидов по настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, делеционные фрагменты и, конкретно, фрагменты FVIII-полипептидов, которые демонстрируют функциональную биологическую активность. Варианты FVIII-полипептидов по настоящему изобретению включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями, связанными с аминокислотными заменами, делециями или вставками. Варианты могут встречаться в природе, такие как аллельные варианты. Под "аллельным вариантом" подразумевают альтернативные формы гена, занимающего данный локус на хромосоме или в геноме организма или вируса. Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985), включено в данный документ ссылкой. Полипептидные варианты могут содержать консервативные и неконсервативные аминокислотные замены, делеции или вставки. Производные FVIII-полипептидов по настоящему изобретению включают полипептиды, которые были изменены так, что они демонстрируют, например, дополнительные признаки, не обнаруженные в нативном полипепти-

де. Примеры включают химерные белки. Аналог представляет собой другую форму FVIII-полипептида по настоящему изобретению. Пример представляет собой про-белок, который может активироваться расщеплением про-белка с получением активного зрелого полипептида.

При использовании в данном документе, термин "вектор" относится к конструкту, сделанному из генетического материала (т.е. из нуклеиновых кислот). Как правило, вектор может представлять собой плазмиду, которая может содержать последовательность начала репликации, которая является функциональной в бактериальных клетках-хозяевах, например *Escherichia coli*, и маркеры селекции для детектирования бактериальных клеток-хозяев, содержащих плазмиду. Плазмиды по настоящему изобретению могут включать генетические элементы, как описано в данном документе, расположенные так, что вставленная кодирующая последовательность может транскрибироваться и транслироваться в эукариотических клетках. Кроме того, в то время как плазида может включать последовательность из вирусной нуклеиновой кислоты, такие вирусные последовательности обычно не вызывают включения плазмиды в вирусную частицу, и плазида, таким образом, не является вирусным вектором. В некоторых воплощениях, описанных в данном документе, плазида представляет собой замкнутую циклическую ДНК-молекулу.

Термин "экспрессия", как правило, относится к биологическому получению продукта, кодируемого кодирующей последовательностей. В большинстве случаев ДНК-последовательность, включающая кодирующую последовательность, транскрибируется с образованием матричной-РНК (мРНК). Матричная-РНК транслируется с образованием полипептидного продукта, который обладает соответствующей биологической активностью. Кроме того, процесс экспрессии может включать дополнительные стадии процессирования до РНК-продукта транскрипции, такие как сплайсинг для удаления интронов, и/или пост-трансляционный процессинг полипептидного продукта.

При использовании в данном документе подразумевается, что термин "полипептид" охватывает единственный "полипептид", а также множество "полипептидов" и включает любую цепь или цепи из двух или более аминокислот. Таким образом, при использовании в данном документе, термины, включающие в частности "пептид", "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин дополнительно включает полипептиды, которые подвергались посттрансляционным модификациям, например, гликозилированию, ацетилированию, фосфорилированию, амидированию, модификации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления или модификации с использованием синтетических аминокислот.

Также в виде полипептидов по настоящему изобретению включены фрагменты, производные, аналоги или варианты чужеродных полипептидов и любая их комбинация. Полипептиды и их фрагменты, производные, аналоги или варианты по настоящему изобретению могут представлять собой биологически функциональные полипептиды, родственные FVIII-полипептидам, которые используются для предотвращения или лечения, т.е. излечения, ослабления, уменьшения тяжести или предотвращения или уменьшения гемофилии А.

"Оптимизация кодонов" определяется как модификация последовательности нуклеиновых кислот для повышения экспрессии в клетках млекопитающего, представляющего интерес, например в клетках хомяка, путем замены по меньшей мере одного, более чем одного или значительного количества кодонов нативной последовательности на кодоны, которые более часто или наиболее часто используются в генах данного млекопитающего или данного типа клеток. Различные виды и типы клеток могут демонстрировать конкретное смещение для некоторых кодонов конкретной аминокислоты.

Множество организмов демонстрируют смещение частоты использования конкретных кодонов для кодирования вставки конкретной аминокислоты в растущей пептидной цепи. Предпочтение кодонов или смещение кодонов, различия в частоте использования кодонов между организмами предусмотрено врожденностью генетического кода и хорошо описано для многих организмов. Смещение кодонов часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая в свою очередь, как считается, зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и от способности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание селективированных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, используемых наиболее часто в пептидном синтезе. Соответственно, гены могут быть приспособлены для генной экспрессии в данном организме на основе оптимизации кодонов.

При условии большого количества генных последовательностей, доступных для широкого спектра вида животных, растений и микробов возможно рассчитать относительную частоту использования кодонов. Таблицы частоты использования кодонов легко доступны, например, в "Базе Данных Применения Кодонов", доступной по адресу www.kazusa.or.jp/codon/ (посещали 19^{-ого} февраля, 2013), и эти таблицы могут быть адаптированы различными путями. См. Nakamura (20). Таблица частоты использования кодонов для человека, рассчитанной на основе данных GenBank, выпуск в виде простого файла 160.0 [Июнь 15 2007]. Эти таблицы используют номенклатуру мРНК и поэтому вместо тимина (Т), который присутствует в ДНК, в таблицах используется урацил (U), который присутствует в РНК. Таблицы были адаптированы так, что частоты рассчитаны для каждой аминокислоты, а не для всех 64 кодонов.

При использовании этих похожих таблиц специалист в данной области может применять частоты к любой данной полипептидной последовательности и получать фрагмент нуклеиновой кислоты оптимизированного по кодомам кодирующего участка, который кодирует полипептид, но который использует кодоны, которые более оптимальны для данного вида. Кодирующие участки с оптимизированными кодонами могут быть сконструированы с помощью различных методов.

В одном методе, называемом "единообразной оптимизацией", таблица частоты использования кодонов используется для обнаружения единственного наиболее частого кодона, используемого для любой данной аминокислоты, и этот кодон используется каждый раз, когда конкретная аминокислота появляется в полипептидной последовательности. В другом методе, называемом "полная оптимизация", фактические частоты кодонов распределены случайно по кодирующему участку. Таким образом, используя метод для оптимизации, если гипотетическая полипептидная последовательность содержит 100 остатков лейцина, то в отношении частоты использования у людей примерно 7 или 7% кодонов лейцина будет представлять собой UUA, примерно 13, или 13% кодонов лейцина будет представлять собой UUG, примерно 13 или 13% кодонов лейцина будет представлять собой CUU, примерно 20 или 20% кодонов лейцина будет представлять собой CUC, примерно 7 или 7% кодонов лейцина будет представлять собой CUA, и примерно 41 или 41% кодонов лейцина будет представлять собой CUG. Эти частоты будут распределены случайно среди кодонов лейцина в кодирующем участке, который кодирует гипотетический полипептид. Специалистам в данной области будет понятно, что распределение кодонов в последовательности может варьироваться значительно при использовании данного метода, однако всегда будет кодироваться один и тот же полипептид.

В использовании метода "полной оптимизации" цельная полипептидная последовательность или ее фрагмент, вариант или производное оптимизированы по кодомам с помощью любого из методов, описанных в данном документе. Различные целевые фрагменты или производные конструируются, и каждый затем оптимизируется по кодомам индивидуально. Альтернативно, полноразмерная полипептидная последовательность оптимизируется по кодомам для данного вида, приводя в результате к получению оптимизированного по кодомам кодирующего участка, который кодирует цельный полипептид, и затем фрагменты нуклеиновой кислоты оптимизированного по кодомам участка, который кодирует фрагменты, варианты и производные полипептида, получают из исходного кодирующего участка с оптимизированными кодонами. Специалисту в данной области хорошо понятно, что если кодоны случайно подставлялись в полноразмерный кодирующий участок на основе их частоты использования в данном виде, то фрагменты нуклеиновых кислот, кодирующие фрагменты, варианты и производные, необязательно будут полностью оптимизированы по кодомам для данного вида. Однако такие последовательности все равно более близки к частоте использования кодонов целевых видов, чем нативная частота использования кодонов. Преимущество такого способа состоит в том, что синтез оптимизированных по кодомам фрагментов нуклеиновых кислот, кодирующих каждый фрагмент, вариант и производное данного полипептида, хотя и является стандартным, он будет затратным по времени и будет приводить к значительному удорожанию.

Также как для *in vitro* применения с целью получения промышленных количеств rFVIII и его вариантов, таких как варианты с делетированным В-доменом для использования в терапии, настоящее изобретение также может применяться для экспрессии rFVIII, как описано в данном документе *in vivo* для потенциального применения в генной терапии пациентов с гемофилией.

Подробное описание

Далее настоящее изобретение будет дополнительно описано с помощью примеров со ссылкой на чертежи, которые демонстрируют:

фиг. 1 (см., также SEQ ID NO: 3) демонстрирует предпочтительную аминокислотную последовательность FVIII с делетированным В-доменом для применения в настоящем изобретении;

фиг. 2 (см., также SEQ ID NO: 1) демонстрирует нуклеиновую последовательность с оптимизированными кодонами, кодирующую аминокислотную последовательность FVIII с делетированным В-доменом, представленную на фиг. 1, для экспрессии в клетках хомяка; и

фиг. 3: (a-f) демонстрирует результаты экспериментов, касающихся жизнеспособности клеток после экспрессии FVIII индивидуально или совместно с VWF. Клетки CHO DG44 трансфицировали указанными ДНК-конструктами. Продемонстрирован процент жизнеспособности трансфицированных клеток, а также продемонстрирован контроль без трансфекции ДНК. Селекцию (G418 или зеонин) инициировали через 48 ч после трансфекции.

Примеры

Введение

Клеточная линия CHO DG44 представляет собой дефицитную по дигидрофолат редуктазе (DHFR) клеточную линию, адаптированную для роста в виде суспензионной культуры. p571_BDDFVIIIsoor представляет собой экспрессирующий вектор (11), содержащий экспрессирующие кассеты для гена Neo, придающего устойчивость к антибиотикам генетин (G418); DHFR, позволяющего DHFR клеткам расти в отсутствие гипоксантина и тимидина; и BDDFVIIIsoor, позволяющий экспрессию человеческого FVIII с делетированным В-доменом. Ранее мы трансфицировали клетки CHO тем же вектором, содержащим не

оптимизированные по кодонам последовательности hFVIII и hBDDFVIII, и повторно получали стабильно трансфицированные клональные клеточные линии, несмотря на плохие характеристики экспрессии (не опубликовано и 12, 13). pcDNA3.1Zeo_VWFcoop базируется на экспрессирующем векторе, содержащем каскету для гена Zeo, придающего устойчивость к антибиотику Зеоцин <http://www.lifetechnologies.com/1/1/10790-pcDNA3-1-zeo-mammalian-expression-vector.html>, и на VWFcoop, дающем возможность экспрессии человеческого VWF.

Материалы и методы

ДНК-конструкты

ДНК-последовательности с оптимизированными кодонами для экспрессии в клетках хомяка, кодирующие человеческий BDDFVIII и VWF, получали путем анализа кДНК-последовательности BDDFVIII SQ (Sanberg et al. (22)) и эталонной последовательности VWF (NP_000543.2), и адаптацию частоты использования кодонов к смещению *Cricetulus griseus* с использованием индекса адаптации кодонов осуществляли с помощью GeneArt (GeneArt AG) с использованием программного обеспечения GeneOptimizer их собственной разработки. Последовательность вариантов нуклеиновой кислоты с оптимизированными кодонами человеческого BDD FVIII и VWF для экспрессии в клетках CHO идентифицировали в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно. Соответствующие аминокислотные последовательности для BDD FVIII и VWF продемонстрированы в SEQ ID NOS: 3 и 4, соответственно. Оптимизация также удаляла последовательности *cis*-действующих мотивов, включая внутренние ТАТА-боксы, *chi*-сайты и сайты входа в рибосому, АТ- или GC-богатые протяженные последовательности, АУ-богатые элементы, ингибирующие и *cis*-действующие элементы последовательностей репрессоров, последовательности повторов, вторичные структуры РНК и все предполагаемые сайты сплайсинга. Оптимизированные гены BDD-FVIIIcoop и VWFcoop синтезировали и клонировали в плазмиды p571 (pNeolG502; Kembell-Cook et al. (11), соответственно. Каждый конструктор полностью секвенировали перед использованием (Source Bio-Science UK Ltd).

Трансфекция и селекция клеток CHO

Клетки CHO DG44 получали из Life Technologies. Клетки поддерживали в среде CD DG44 с добавлением 8 ммоль/л глутамина и 0,1% плуроника F-68 (Life Technologies) при 37°C, 5% CO₂ на круговом шейкере (120 об./мин.). Клетки CHO DG44 с жизнеспособностью >95% использовали во всех трансфекциях. 18 мкг линейаризованной плазмидной ДНК использовали в каждой трансфекции. Клетки трансфицировали с использованием реагента Freestyle MAX согласно инструкциям производителя (Life Technologies). Вкратце, 18 μ л плазмидной ДНК и 15 μ л реагента Freestyle MAX в среде OptiPRO SFM инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, чтобы дать возможность образования комплексов ДНК-липид. Комплекс затем переносили в 125-мл флакон, содержащий 30 мл клеток ($0,5 \times 10^6$ клеток/мл) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе на круговом шейкере (120 об./мин.). Через 48 ч после трансфекции к культуре добавляли либо G418 (250 μ г/мл), либо зеоцин (200 μ г/мл) для селекции BDDFVIIIcoop или VWFcoop, соответственно. Подсчет клеток (всех и не жизнеспособных) осуществляли каждые 3-4 дня с использованием Nucleocounter согласно инструкциям производителя (Sartorius Stemdim).

Анализ ПЦР

Клетки анализировали с помощью анализа ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, сконструированных для амплификации ампликонов, с получением перекрывающихся фрагментов по всей кодирующей последовательности и стыковкам вектора с кДНК. Вкратце, 100 μ л клеток ($2,97 \times 10^5$ клеток) собирали путем центрифугирования и ресуспендировали в 75 μ л реагента щелочного лизиса (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA pH 12), и инкубировали при 95°C в течение 30 мин перед добавлением 75 μ л нейтрализующего реагента (40 mM TRIS pH 5). Реакции ПЦР осуществляли с использованием 1 μ л экстрагированной ДНК в качестве матрицы, мастер-микса ПЦР (Promega), 1 μ моль/л 5'- и 3'-олигонуклеотидных праймеров (Sigma Genosys) с использованием программы ПЦР: 95°C, 3 мин; 95°C, 30 с; 55°C, 30 с; 72°C 60 с с повторением в течение 30 циклов и в конце 72°C, 10 мин. Фрагменты ПЦР анализировали с помощью электрофореза на агарозном геле.

Измерение FVIII

Активность кофактора образцов среды оценивали с использованием Biophen FVIII:C Хромогенного анализа (Quadrantech Diagnostics) согласно инструкциям производителя. Стандартную кривую строили с использованием последовательных разведений 1:2 плазма-калибратора (Biophen; Quadrantech Diagnostics). Стандарты и образцы оценивали в дубликатах.

Результаты

Клетки CHO DG44 трансфицировали линейаризованной плазмидной ДНК каждой из (p571_BDDFVIIIcoop или pcDNA3.1Zeo_VWFcoop) и культивировали в течение 48 ч, после чего начинали селекцию стабильно трансфицированных клеток путем добавления подходящего антибиотика для селекции (G418 (женетecin) для BDDFVIIIcoop и зеоцин для VWFcoop). Подсчет клеток осуществляли каждые 3-4 дня для определения жизнеспособности клеток (фиг. 3А).

Клетки CHO DG44, не трансфицированные p571_BDDFVIIIcoop, были чувствительны к G418, и

жизнеспособность клеток составляла ноль через 14 дней селекции, что прогнозировалось на основе результатов теста чувствительности к G418, который осуществляли на нетрансфицированных клетках CHO DG44. Большинство клеток в клеточной культуре, трансфицированной с использованием p571_BDDFVIIIсоор, также были чувствительны к G418, демонстрируя как нетрансфицированные клетки, так и клетки, в которых отсутствовала стабильная интеграция. По сравнению с нетрансфицированным контролем жизнеспособность клеток p571_BDDFVIIIсоор-трансфицированной культуры оставалась выше нуля, предполагая присутствие стабильно трансфицированных клеток. Однако на 41 день жизнеспособность падала до нуля (фиг. 3А). Данный эксперимент повторяли еще два раза и в обоих случаях наблюдали аналогичный профиль (фиг. 3В и 3С). В каждом из этих трех случаев не получали стабильных трансфектантов. ДНК, полученные из клеток через 38 дней после трансфекции, были положительными согласно ПЦР для последовательности p571_BDDFVIIIсоор. Следовательно, клетки CHO DG44 были успешно трансфицированы экспрессирующим вектором, что очевидно по устойчивости к G418 при концентрации, которая убивает нетрансфицированные клетки, и по положительному результату ПЦР для экспрессирующей кассеты. Неспособность получить стабильные жизнеспособные трансфектанты оказалась неожиданной, и может быть связана с высоким уровнем экспрессии BDDFVIIIсоор, приводящим к апоптозу.

Клетки CHO DG44, не трансфицированные p571_BDDFVIIIсоор, были чувствительны к Зеоцину, и жизнеспособность клеток составляла ноль через 14 дней селекции, что прогнозировалось на основе результатов теста чувствительности к Зеоцину, который осуществляли на нетрансфицированных клетках CHO DG44. Большинство клеток в клеточной культуре, трансфицированной с использованием pcDNA3.1Zeo_VWFсоор, также были чувствительны к Зеоцину, демонстрируя как нетрансфицированные клетки, так и клетки, в которых отсутствовала стабильная интеграция. По сравнению с нетрансфицированным контролем жизнеспособность клеток pcDNA3.1Zeo_VWFсоор-трансфицированной культуры оставалась выше нуля, предполагая присутствие стабильно трансфицированных клеток. Жизнеспособность клеток быстро восстанавливалась и через 23 дня после трансфекции 97% культуры было жизнеспособно (фиг. 3D). Жизнеспособные растущие культуры этих клеток были получены, и с помощью ПЦР продемонстрировали, что они содержат цельную VWFсоор-экспрессирующую кассету.

Клетки CHO DG44, стабильно трансфицированные pcDNA3.1Zeo_VWFсоор, затем трансфицировали p571_BDDFVIIIсоор. Клетки CHO DG44, не трансфицированные p571_BDDFVIIIсоор, были чувствительны к G418, и жизнеспособность клеток составляла ноль через 15-17 дней селекции, что прогнозировалось на основе результатов теста чувствительности к G418, который осуществляли на нетрансфицированных клетках CHO DG44. Большинство клеток в клеточной культуре, трансфицированной с использованием p571_BDDFVIIIсоор, также были чувствительны к G418, демонстрируя как нетрансфицированные клетки, так и клетки, в которых отсутствовала стабильная интеграция. По сравнению с нетрансфицированными контрольными клетками и ранее трансфицированными CHO DG44 с использованием p571_BDDFVIIIсоор, жизнеспособность культуры CHO DG44_pcDNA3.1Zeo_VWFсоор, трансфицированной p571_BDDFVIIIсоор, оставалась выше нуля, предполагая присутствие стабильно трансфицированных клеток. Жизнеспособность клеток быстро восстанавливалась, и через 27 дней после трансфекции >97% культуры было жизнеспособно (фиг. 3Е). Трансфекцию повторяли и получали аналогичные результаты (фиг. 3F). В обоих этих случаях растущие культуры этих клеток были получены, и с помощью ПЦР было продемонстрировано, что они содержат цельные экспрессирующие кассеты BDDFVIIIсоор и VWFсоор. Эти поликлональные клеточные популяции затем оценивали на предмет экспрессию среднего уровня 0,003 пг/на клетку/в день перед амплификацией с метотрексатом. Уровень активности полученного материала также анализировали (с использованием хромогенного анализа FVIII:C и плазмокалибратора Biophen), обнаружив, что большинство полученного материала было биологически активно.

Эти поликлональные клетки затем подвергали процедуре клональной селекции, состоящей из:

получения 30 мл культуры клеток до количества клеток 1×10^6 клеток/мл;

разведения клеток с помощью последовательного 10-кратного разведения до концентрации < 0,05 клеток/мл в среде OptiCHO (LifeTech);

высевания 0,2 мл этих клеток в стерильные 96-луночные планшеты Edge Plate (Thermo Scientific Nunc).

Испарение среды из периметра лунок микропланшета является существенной проблемой, особенно когда клетки растут в течение >3 дней. По мере того, как среда испаряется с течением времени (даже в увлажняемой среде), концентрация компонентов среды изменяется, влияя на клеточный рост и производительность. Традиционный способ решения этой проблемы - это заполнить лунки стерильной водой или PBS. Альтернативой является применение Nunc Edge 96-луночных планшеты, которые имеют емкость, окружающую внешнюю область планшета, которая может быть заполнена стерильной водой, предотвращая испарение из внутренних лунок. В данном случае могут использоваться все 96 лунок.

Планшеты затем спокойно инкубировали в течение 10-14 дней в 37°C, 5% CO₂ инкубаторе без встряхивания.

Растущие клетки переносили из 96-луночных планшеты в 24-луночные планшеты с помощью пипетирования клеток вверх и вниз, перенося все содержимое одной лунки в единственную лунку 24-

луночного планшета, содержащего 1 мл свежей полной среды OptiCHO.

Среду затем анализировали на FVIII-антиген и на активность с помощью стандартных процедур.

Тест на микоплазму проводили постоянно.

Эта процедура привела к выделению трех клеточных линий, экспрессирующих rhFVIII в количестве 0,03-4 пг/на клетку/в день.

Поликлональные популяции клеток, полученные в данном процессе, затем подвергали метотрексатной амплификации (начиная от 0,2 μ M MTX и повышая на 0,1 μ M на каждой стадии) для повышения количества копий rhFVIII-экспрессирующей кассеты. Продуктивность клеток оценивали постоянно с помощью вышеописанных способов. У клеток, амплифицированных до уровня 0,5 μ M MTX, повышалась продуктивность rhFVIII. За границей этого уровня MTX продуктивность rhFVIII резко падала. Поликлональные клетки, полученные на данной стадии, экспрессировали rhFVIII в количестве $\geq 0,1$ пг/на клетку/в день.

Эти поликлональные клетки могут подвергаться процедуре клональной селекции, как описано выше. Это приведет к выделению клеточных линий, экспрессирующих rhFVIII на повышенном уровне, возможно составляющем 0,3-0,4 пг/на клетку/в день.

Список литературы

1. Zhang et al Nat. Genet. (2003) 34: 220-225
2. Zhang et al J. Biol. Chem. (2005) 280: 25881-25886
3. Pipe, Haemophilia (2009) 15: 1187-1196
4. Pittman, et al Blood (1994) 84: 4214-4225
5. Malhotra et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2008) 105: 18525-18530
6. Kaufman et al, J. Biol. Chem. (1988) 263: 6352-6362 and USJ, 198, 349
7. Miao et al, Blood (2004) 103: 3412-3419
8. Ward et al, Blood (2011) 117:798-807
9. Marin, Biotechnol J. (2008) 3: 1047-1057
10. Tsai et al, J. Mol. Biol. (2008) 383: 281-291
11. Kembball-Cook et al, Gene (1994) 139: 275-279
12. David et al, J Thromb Haemost (2003) 1: 139-146
13. David et al, B.J. Haem. (2001) 113:604-615
14. Wise et al, JBiolChem (1991) 266, 21948-21955
15. Kolind et al, JBiotec (2011) 151, 357-362)
16. Spencer et al, Molecular Therapy (2011), 19/2, 302-309.
17. Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621)
18. Lorimer D, Raymond A, Walchli J, Mixon M, Barrow A, Wallace E, Grice R, Burgin A, Stewart L., BMC Biotechnol. 2009 9:36)
19. Bowie, et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," Science 247:1306-1310 (1990).
20. Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000).
21. Davis LGG et al., Basic Methods in Molecular Biology, (2nd Ed., McGraw-Hill, 1995).
22. Sanberg et al (2001) Thromb Haemost 85, 93-100.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения стабильной рекомбинантной клетки млекопитающего, экспрессирующей VWF одновременно с FVIII или его вариантом FVIII с делетированным В-доменом *in vitro*, включающий обеспечение клетки млекопитающего, трансфекцию клетки вектором, способным рекомбинантно экспрессировать VWF, и затем последующую трансфекцию клеток, трансфицированных VWF, вектором, способным рекомбинантно экспрессировать FVIII или вариант FVIII с делетированным В-доменом, причем указанные векторы содержат конструкторы нуклеиновых кислот, оптимизированные по кодонам.

2. Способ п.1, включающий добавление метотрексата к культуральной среде в концентрации до 0,5 мкМ.

3. Стабильная рекомбинантная клетка млекопитающего, получаемая способом по п.1 или 2, которая способна к экспрессии VWF одновременно с FVIII млекопитающего или его вариантом с делетированным В-доменом *in vitro*.

4. Клетка млекопитающего по п.3, где FVIII млекопитающего представляет собой человеческий FVIII или вариант человеческого FVIII с делетированным В-доменом.

5. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где клетка представляет собой клетку 293, CHO, 3T3, BHK, MICK, Varo, Junket или клетку HeLa, а также производные таких клеток, известные в данной области.

6. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где FVIII млекопитающего представляет собой человеческий FVIII или вариант человеческого FVIII с делетированным В-доменом, оптимизированные по кодонам для хомяка, и клетка млекопитающего представляет собой клетку CHO или BHK.

7. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пп.4-6, где аминокислотная последовательность FVIII представляет собой последовательность FVIII, из которой был делетирован В-домен и необязательно замененный на короткий спейсерный В-домен, богатый аспарагин-связанными олигосахаридами.

8. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность FVIII представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

9. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая FVIII млекопитающего по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3.

10. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность VWF представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2.

11. Клетка млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, где аминокислотная последовательность VWF представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4.

12. Клеточная культура, содержащая клетку млекопитающего по любому из предыдущих пунктов, которая способна экспрессировать FVIII в количестве $\geq 0,1$ пг/на клетку/в день.

13. Способ получения рекомбинантного FVIII млекопитающего или его варианта с делетированным В-доменом, либо комплекса, содержащего указанные FVIII и его вариант, причем способ включает культивирование клетки по любому из пп.-11, выделение и очистку указанных FVIII и его варианта из клетки и/или культуральной среды.

```

      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDI GELPVDARFP PRVPKSFPPN

      70      80      90     100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TSVVYKKTIF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV

     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH

     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VDLVKDLNSG LIGALLVCRE GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD

     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AASARAWPKM HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH

     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE EPQLRMKNNE

     370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA

     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL

     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
LIIFKNQASR PYNIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP

     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TKSDPRCLTR YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE

     610     620     630     640     650     660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
NRSWYLTEI NI QRFNPNAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAYWYILS

     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTTLTF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG

     730     740     750     760     770     780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
MTALLKVSSC DKNTGDYYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNPVPLKR HQREITRTTL

     790     800     810     820     830     840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
QSDQEEIDYD DTISVEMKKE DFDIYDEEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP

     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HVLNRNAQSG SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF

```

```

          910          920          930          940          950          960
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP TKDEFDCKAW

          970          980          990          1000          1010          1020
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE FALFFTIFDE TKSIFYTENM

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI MDLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
VYSNKCQTPL GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV FFGNVDSSGI

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
KHNIIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY

          1330          1340          1350          1360          1370          1380
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM

          1390          1400          1410          1420          1430          1440
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
YVKEFLISSS QDGHQWTLFF QNGKVQVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH

          1450
.....|.....| .....|.....
QIALRMEVLG CEAQDLY

```

Фиг. 1

```

      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCGGCCGCGCCACCATGCAGATCGAGCTGTCCACCTGCTTTTTTCTGTGCCTGCTGCGGT
      M Q I E L S T C F F L C L L R

      70      80      90     100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCTGCTTCAGCGCCACCCGGCGGTACTACCTGGGCGCCGTGGAGCTGTCCTGGGACTACA
      F C F S A T R R Y Y L G A V E L S W D Y

     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCTGTGGACGCCCGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGA
      M Q S D L G E L P V D A R F P P R V P K

     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTTCCCCCTTCAACACCAGCGTGGTGTACAAGAAAACCCTGTTCGTGGAGTTCACCGACC
      S F P F N T S V V Y K K T L F V E F T D

     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCTGTTCAATATCGCCAAGCCAGGCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCC
      H L F N I A K P R P P W M G L L G P T I

     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGA
      Q A E V Y D T V V I T L K N M A S H P V

     370     380     390     400     410     420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCTGACACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCAGCGAGGGCGCCGAGTACGACGACC
      S L H A V G V S Y W K A S E G A E Y D D

     430     440     450     460     470     480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGACCAGCCAGCGGGAGAAAGAAGATGACAAGGTGTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTACG
      Q T S Q R E K E D D K V F P G G S H T Y

     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGTGGCAGGTGCTGAAAGAAAACGGCCCCATGGCCTCCGACCCCTGTGCCTGACCTACA
      V W Q V L K E N G P M A S D P L C L T Y

     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACAGCGGCCTGATCGGCGCTCTGC
      S Y L S H V D L V K D L N S G L I G A L

     610     620     630     640     650     660
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCGTCTGCCGGGAGGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCC
      L V C R E G S L A K E K T Q T L H K F I

```

```

      670      680      690      700      710      720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGA
L L F A V F D E G K S W H S E T K N S L

      730      740      750      760      770      780
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGCAGGACCGGGACGCCGCCTCTGCCAGAGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCT
M Q D R D A A S A R A W P K M H T V N G

      790      800      810      820      830      840
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACGTGAACAGAAGCCTGCCCGGCCTGATTGGCTGCCACCGGAAGAGCGTGTACTGGCAGC
Y V N R S L P G L I G C H R K S V Y W H

      850      860      870      880      890      900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATCGGCATGGGCACCACACCCGAGGTGCACAGCATCTTTCTGGAAGGGCACACCTTTC
V I G M G T T P E V H S I F L E G H T F

      910      920      930      940      950      960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGTCCGGAACCAACCGGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGCCCTATCACCTTCCTGACCGCCC
L V R N H R Q A S L E I S P I T F L T A

      970      980      990      1000      1010      1020
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGACACTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCTCACCAGC
Q T L L M D L G Q F L L F C H I S S H Q

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACGACGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACTCTTGCCCCGAGGAACCCAGCTGCGGA
H D G M E A Y V K V D S C P E E P Q L R

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACG
M K N N E E A E D Y D D D L T D S E M D

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGTGCGGTTTCGACGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGA
V V R F D D D N S P S F I Q I R S V A K

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCCC
K H P K T W V H Y I A A E E E D W D Y A

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCCTGGTGCTGGCCCCCGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCC
P L V L A P D D R S Y K S Q Y L N N G P

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGCGGATCGGCCGGAAGTACAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACATTCA
Q R I G R K Y K K V R F M A Y T D E T F

```

```

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGACCCGGGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTACGGCGAAG
K T R E A I Q H E S G I L G P L L Y G E

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGGCGACACACTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCTAGCCGGCCCTACAACATCTACC
V G D T L L I I F K N Q A S R P Y N I Y

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCCACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTACAGCAGGCGGCTGCCAAGGGCGTGAAGC
P H G I T D V R P L Y S R R L P K G V K

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCGCGCGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCG
H L K D F P I L P G E I F K Y K W T V T

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGAGGACGGCCCCACCAAGAGCGACCCAGATGCCTGACCCGGTACTACAGCAGCTTCG
V E D G P T K S D P R C L T R Y Y S S F

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGAACATGGAACGGGACCTGGCCTCCGGGCTGATCGGACCTCTGCTGATCTGTACAAAG
V N M E R D L A S G L I G P L L I C Y K

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAAGCGTGGACCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGCGGAACGTGATCCTGTTCA
E S V D Q R G N Q I M S D K R N V I L F

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCGTGTTTCGATGAGAACCGGTCCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCA
S V F D E N R S W Y L T E N I Q R F L P

      1870      1880      1890      1900      1910      1920
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACCCTGCGGGCGTGACAGCTGGAAGATCCCGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCA
N P A G V Q L E D P E F Q A S N I M H S

      1930      1940      1950      1960      1970      1980
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCAATGGCTACGTGTTTCGACTCTCTGCAGCTCTCCGTGTGTCTGCACGAGGTGGCCTACT
I N G Y V F D S L Q L S V C L H E V A Y

      1990      2000      2010      2020      2030      2040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGTACATCCTGAGCATCGGCGCCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTCTTCAGCGGCTACA
W Y I L S I G A Q T D F L S V F F S G Y

      2050      2060      2070      2080      2090      2100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTTCAAGCACAAAGATGGTGTACGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCTTTTCAGCGGCGAGA
T F K H K M V Y E D T L T L F P F S G E

```

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGTGTTCATGAGCATGAAAAACCCCGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACAGCGACT
T V F M S M E N P G L W I L G C H N S D

      2170      2180      2190      2200      2210      2220
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCGGAACCGGGGCATGACCGCCCTGCTGAAGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCG
F R N R G M T A L L K V S S C D K N T G

      2230      2240      2250      2260      2270      2280
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTACTACGAGGACAGCTACGAGGATATCAGCGCCTACCTGCTGTCCAAGAACAACGCCA
D Y Y E D S Y E D I S A Y L L S K N N A

      2290      2300      2310      2320      2330      2340
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCGAACCCCGAGCTTCAGCCAGAACCCCCCGTGTGAAGCGTCACCAGCGGGAGATCA
I E P R S F S Q N P P V L K R H Q R E I

      2350      2360      2370      2380      2390      2400
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCCGGACAACCTGCAGTCCGACCAGGAAGAGATCGATTACGACGACCATCAGCGTGG
T R T T L Q S D Q E E I D Y D D T I S V

      2410      2420      2430      2440      2450      2460
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGATGAAGAAAGAGGATTTCGATATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGAAGCT
E M K K E D F D I Y D E D E N Q S P R S

      2470      2480      2490      2500      2510      2520
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCAGAAGAAAACCCGGCACTACTTCATTGCCCGCGTGGAGAGGCTGTGGGACTACGGCA
F Q K K T R H Y F I A A V E R L W D Y G

      2530      2540      2550      2560      2570      2580
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGAGTTCTAGCCCCACGTGCTGCGGAACCGGGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCA
M S S S P H V L R N R A Q S G S V P Q F

      2590      2600      2610      2620      2630      2640
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAAAGTGGTGTTCAGGAATTCACAGACGGCAGCTTCACCCAGCCTCTGTATAGAGGCG
K K V V F Q E F T D G S F T Q P L Y R G

      2650      2660      2670      2680      2690      2700
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGCTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGGCCCTACATCAGGGCCGAAGTGGAGGACAACA
E L N E H L G L L G P Y I R A E V E D N

      2710      2720      2730      2740      2750      2760
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCATGGTGACCTTCCGGAATCAGGCCAGCAGACCCTACTCCTTCTACAGCAGCCTGATCA
I M V T F R N Q A S R P Y S F Y S S L I

      2770      2780      2790      2800      2810      2820
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCTACGAAGAGGACCAGCGGCAGGGCGCCGAACCCGGAAGAACTTCGTGAAGCCCAACG
S Y E E D Q R Q G A E P R K N F V K P N

```

```

      2830      2840      2850      2860      2870      2880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTGCAGCACCACATGGCCCCCACCAGGACGAGTTCG
E T K T Y F W K V Q H H M A P T K D E F

      2890      2900      2910      2920      2930      2940
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCAGCGACGTGGATCTGGAAAAGGACGTGCACTCTGGAC
D C K A W A Y F S D V D L E K D V H S G

      2950      2960      2970      2980      2990      3000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACTAACACCCTCAACCCCGCCACGGCCGCCAGG
L I G P L L V C H T N T L N P A H G R Q

      3010      3020      3030      3040      3050      3060
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGACCGTGCAGGAATTGCCTGTCTTCAACCATCTTCGACGAGACAAAGTCTGGTACT
V T V Q E F A L F F T I F D E T K S W Y

      3070      3080      3090      3100      3110      3120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCACCGAGAAATATGGAACGGAAGTGCAGAGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCTA
F T E N M E R N C R A P C N I Q M E D P

      3130      3140      3150      3160      3170      3180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACCCTGCCTG
T F K E N Y R F H A I N G Y I M D T L P

      3190      3200      3210      3220      3230      3240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCTGGTGTATGGCCCAGGACCAGAGAAATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCAGCAACG
G L V M A Q D Q R I R W Y L L S M G S N

      3250      3260      3270      3280      3290      3300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AGAATATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCGTGCGGAAGAAAGAGAGT
E N I H S I H F S G H V F T V R K K E E

      3310      3320      3330      3340      3350      3360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCCGGCGTGTTCGAGACAGTGGAGATGCTGCCCA
Y K M A L Y N L Y P G V F E T V E M L P

      3370      3380      3390      3400      3410      3420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCAAGGCCGGCATCTGGCGGGTGGAGTGTCTGATCGGCGAGCACCTGCACGCTGGCATGA
S K A G I W R V E C L I G E H L H A G M

      3430      3440      3450      3460      3470      3480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCACCCTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCACTGGGCATGGCCTCTGGCC
S T L F L V Y S N K C Q T P L G M A S G

      3490      3500      3510      3520      3530      3540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ACATCCGGGACTTCCAGATCACCGCTCCGGCCAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGG
H I R D F Q I T A S G Q Y G Q W A P K L

```

```

      3550      3560      3570      3580      3590      3600
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCAGACTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGTCCACCAAAGAGCCCTTCAGTGGA
A R L H Y S G S I N A W S T K E P F S W

      3610      3620      3630      3640      3650      3660
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCTATGATCATCCACGGCATTAAAGACCCAGGGCGCCAGGC
I K V D L L A P M I I H G I K T Q G A R

      3670      3680      3690      3700      3710      3720
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGA
Q K F S S L Y I S Q F I I M Y S L D G K

      3730      3740      3750      3760      3770      3780
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGTGGCAGACCTACCGGGCAACAGCACCGGCACCCTGATGGTGTCTTCGGCAATGTGG
K W Q T Y R G N S T G T L M V F F G N V

      3790      3800      3810      3820      3830      3840
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACAGCAGCGGCATCAAGCACAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCCGGTACATCCGGC
D S S G I K H N I F N P P I I A R Y I R

      3850      3860      3870      3880      3890      3900
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCACCCCACTACAGCATTAGATCCACACTGAGAATGGAAGTGGTGGCTGCGACC
L H P T H Y S I R S T L R M E L M G C D

      3910      3920      3930      3940      3950      3960
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGAACTCCTGCAGCATGCCTCTGGGCATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCAGATCA
L N S C S M P L G M E S K A I S D A Q I

      3970      3980      3990      4000      4010      4020
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTGCGCCACCTGGTCCCCCTCCAAGGCCAGGCTGC
T A S S Y F T N M F A T W S P S K A R L

      4030      4040      4050      4060      4070      4080
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACCTGCAGGGCCGGTCCAACGCCTGGCGGCCTCAGGTCAACAACCCCAAAGAATGGCTGC
H L Q G R S N A W R P Q V N N P K E W L

      4090      4100      4110      4120      4130      4140
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGTGGACTTTTCAGAAAACCATGAAGGTGACCGGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAAAGCC
Q V D F Q K T M K V T G V T T Q G V K S

      4150      4160      4170      4180      4190      4200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCTGACCAGCATGTACGTGAAAGAGTTTCTGATCAGCAGCTCTCAGGATGGCCACCAGT
L L T S M Y V K E F L I S S S Q D G H Q

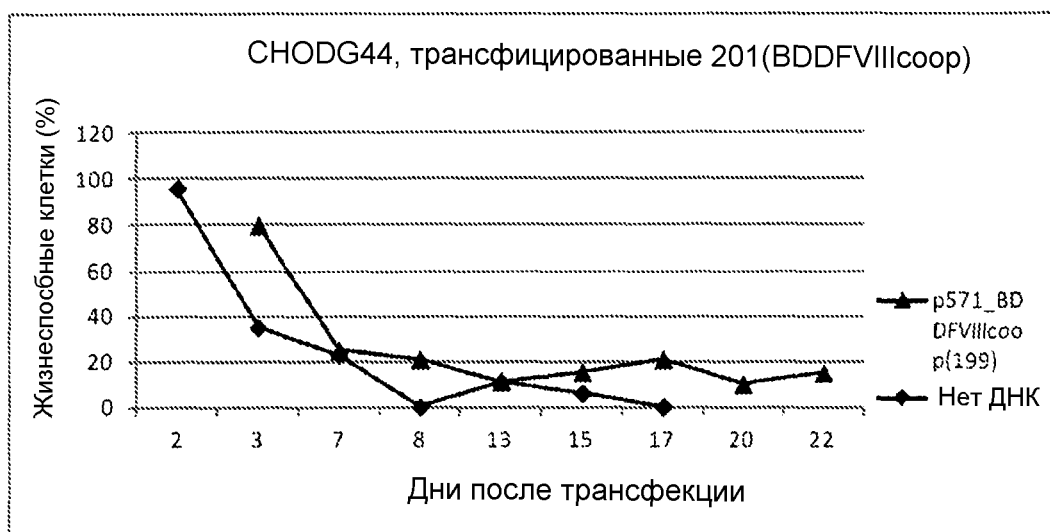
      4210      4220      4230      4240      4250      4260
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGACCCTGTCTTTTCAGAACGGCAAGGTGAAAGTGTTCAGGGCAACCAGGACTCCTTCA
W T L F F Q N G K V K V F Q G N Q D S F

```

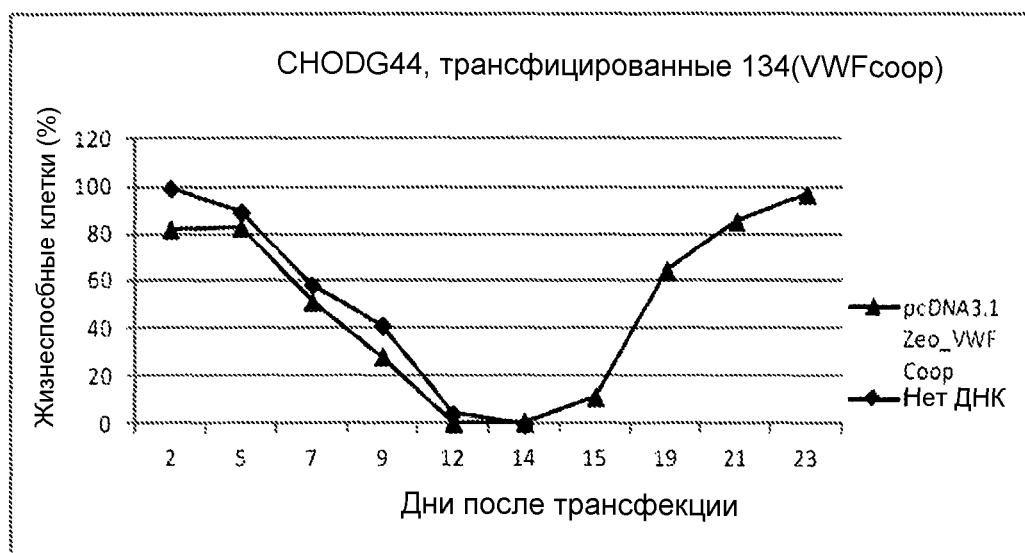
A



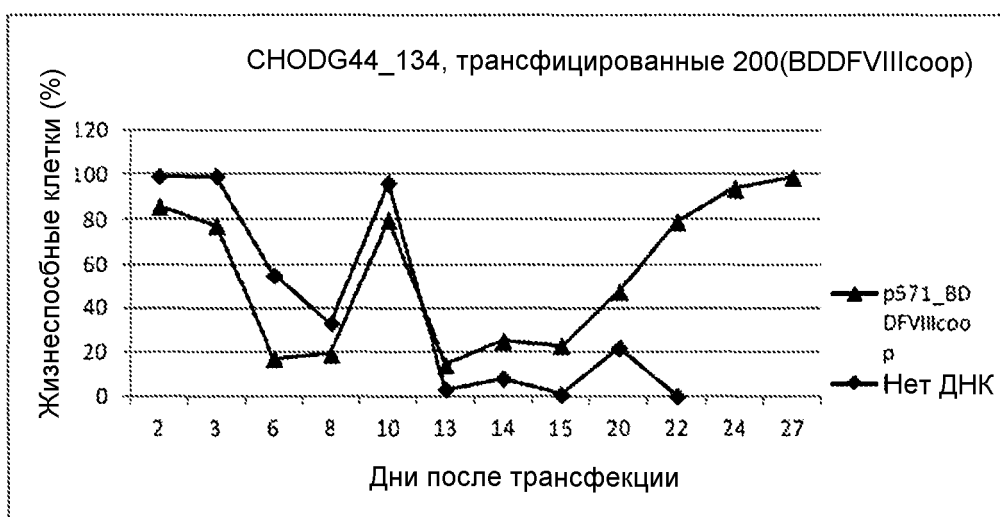
C



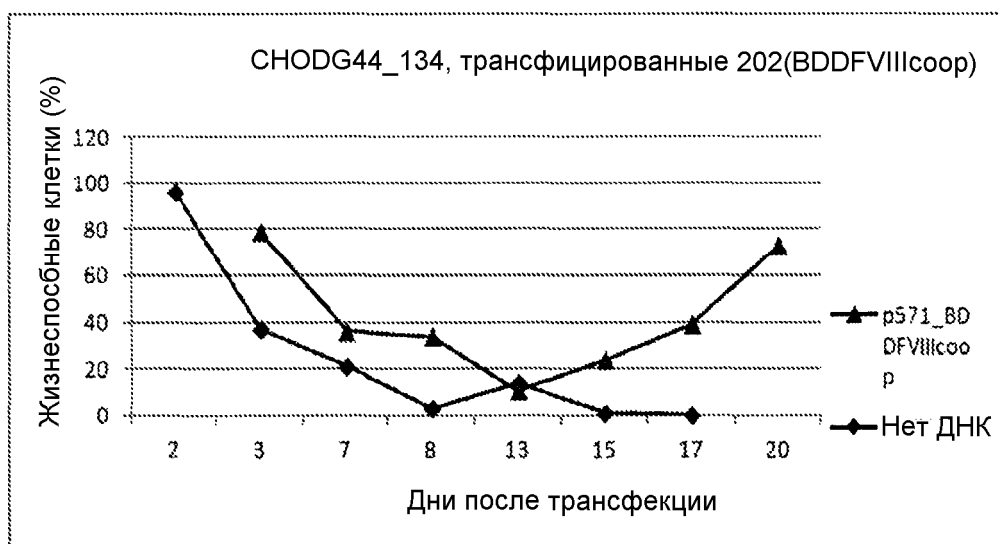
D



Г



Г



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2