



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/63 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020136988, 10.11.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.11.2020

Дата регистрации:
11.06.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.11.2020

(45) Опубликовано: 11.06.2021 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора,
зав. патентным отделом Мистюнину Ю.Н.

(72) Автор(ы):

Исаева Анастасия Александровна (RU),
Несмеянова Валентина Сергеевна (RU),
Зыбкина Анастасия Владимировна (RU),
Щербаков Дмитрий Николаевич (RU),
Шаньшин Даниил Васильевич (RU),
Волкова Наталья Вячеславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2713723 C1, 06.02.2020. WO
2019025984 A1, 07.02.2019. WO 2020132382 A1,
25.06.2020.

(54) Универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плаزمидная конструкция pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антител ADI-15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих и полученная с использованием вектора pVEAL

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плазмидная конструкция pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антител ADI-15742, способных нейтрализовать вирус Эбола в клетках млекопитающих. Универсальный интеграционный вектор pVEAL служит для создания целевых плазмидных конструкций, обеспечивающих синтез и секрецию scFv-Fc моноклональных антител, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 1 и содержит элементы в соответствии с физической и генетической картой, представленной на Фиг. 1. Плазмидная генетическая конструкция pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию

целевого белка scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 2 и содержит элементы в соответствии с физической и генетической картой, представленной на Фиг. 2. Техническим результатом заявляемого изобретения является создание универсального интеграционного вектора pVEAL и плазмидной генетической конструкции pVEAL-15742, обеспечивающей синтез и секрецию целевого белка scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих CHO-K1, полученного с использованием указанного универсального вектора pVEAL. 2 н.п. ф-лы, 6 ил., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 15/63 (2021.02)

(21)(22) Application: **2020136988, 10.11.2020**

(24) Effective date for property rights:
10.11.2020

Registration date:
11.06.2021

Priority:

(22) Date of filing: **10.11.2020**

(45) Date of publication: **11.06.2021 Bull. № 17**

Mail address:

**630559, Novosibirskaya obl., r.p. Koltsovo, FBUN
GNTS VB "Vektor" Rospotrebnadzora, zav.
patentnym otdelom Mistyurinu YU.N.**

(72) Inventor(s):

**Isaeva Anastasiya Aleksandrovna (RU),
Nesmeyanova Valentina Sergeevna (RU),
Zybkina Anastasiya Vladimirovna (RU),
Shcherbakov Dmitrij Nikolaevich (RU),
Shanshin Daniil Vasilevich (RU),
Volkova Natalya Vyacheslavovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
biotekhnologii "Vektor" Federalnoj sluzhby po
nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i
blagopoluchiya cheloveka (FBUN GNTS VB
"Vektor" Rospotrebnadzora) (RU)**

(54) **UNIVERSAL INTEGRATION VECTOR pVEAL AND RECOMBINANT PLASMID pVEAL-15742, PROVIDING SYNTHESIS AND SECRETION OF scFv-Fc ANTIBODIES AGAINST EBOLA VIRUS ADI-15742 IN MAMMALIAN CELLS AND OBTAINED USING pVEAL VECTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Described is the universal integration vector pVEAL and the recombinant plasmid pVEAL-15742, which provides the synthesis and secretion of scFv-Fc antibodies ADI-15742 capable of neutralizing the Ebola virus in mammalian cells. The universal integration vector pVEAL is used to create target plasmid constructs that provide for the synthesis and secretion of scFv-Fc monoclonal antibodies, has the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 and contains elements in accordance with the physical and genetic map shown in Fig. 1. The plasmid genetic construct pVEAL-15742,

which provides the synthesis and secretion of the target protein scFv-Fc of the anti-Ebola virus ADI 15742 antibody, has the nucleotide sequence of SEQ ID No. 2 and contains elements in accordance with the physical and genetic map shown in Fig. 2.

EFFECT: creation of a universal integration vector pVEAL and a plasmid genetic construct pVEAL-15742, which provides the synthesis and secretion of the target protein scFv-Fc of the ADI 15742 antibody against the Ebola virus in mammalian CHO-K1 cells, obtained using the specified universal vector pVEAL.

2 cl, 6 dwg, 5 ex

Изобретение относится к универсальному интеграционному вектору pVEAL и рекомбинантной плазмиде pVEAL-15742, обеспечивающей синтез и секрецию scFv-Fc антител ADI-15742, способных нейтрализовать вирус Эбола в клетках млекопитающих с применением универсального вектора pVEAL и может быть использовано в молекулярной генетике и биотехнологии.

Уровень техники. Препараты на основе моноклональных антител являются наиболее перспективным инструментом экстренного противодействия вирусам вследствие их высокой специфичности и минимальным побочным эффектам. В настоящий момент по меньшей мере 570 антител по всему миру прошли клинические испытания (Lu R.M. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*. 2020; 27(1): 1-30; Wong G. et al. Post-exposure therapy of filovirus infections. *Trends Microbiol*. 2014; 22(8):456-63; Saphire E.O. An update on the use of antibodies against the filoviruses. *Immunotherapy*. 2013; 5(11): 1221- 33). Значительные технологические достижения сделали открытие и разработку методов лечения с помощью моноклональных антител более быстрыми и эффективными.

В настоящее время широко распространено получение антител формата scFv-Fc. Это одноцепочечные (single chain) антитела, состоящие из переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей антитела и константной цепи. У scFv-Fc формата существует несколько преимуществ перед большими фрагментами или целыми антителами: меньшее количество сайтов расщепления для циркулирующих протеолитических ферментов и, следовательно, более высокая стабильность; scFv-Fc вариант подразумевает синтез одной цепи, что облегчает создание векторов и конструкций, упрощает схему получения и проверки, одноцепочечные антитела достигают цели быстрее, быстрее выводятся из организма (Huston J.S. et al. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods in enzymology*. 1991, 203: 46-88; WO 1993/16185; US 5571894). Возможные аллергические реакции на неканоническую структуру несущественны в случае антител против инфекционных заболеваний. Такие антитела, в первую очередь должны обладать эффективностью (Jäger V. et al. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC biotechnology*. 2013, 13(1): 52; Girgis M.D. et al. Targeting CEA in pancreas cancer xenografts with a mutated scFv-Fc antibody fragment. *EJNMMI research*. 2011, 1(1): 1-10).

Одним из способов получения моноклональных scFv-Fc антител является встройка нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные последовательности тяжелой и легкой цепей антител, в интеграционные вектора. Эти вектора обеспечивают репликацию и экспрессию рекомбинантных генных конструкций в подходящем хозяине путем интеграции в хромосому данного хозяина. Интеграционный вектор включает в себя: рекомбинантные иммуноглобулиновые домены, точку начала репликации или автономно реплицирующуюся последовательность, доминантные маркерные последовательности, сигнальные последовательности, последовательности, контролируемые экспрессию и транскрипцию рекомбинантных генов, систему, отвечающую за интеграцию в геном (RU 2469093 C2, RU 2639519). Трансфекция линий клеток млекопитающих данными векторами и дальнейшее их культивирование позволяет клеткам синтезировать антитела непосредственно в культуральную жидкость (RU 2292353 C2).

В качестве интеграционного вектора могут выступать системы доставки на основе вирусов и невирусные ДНК-векторы. Системы доставки на основе вирусов имеют следующие недостатки: 1) препараты вирусов имеют риск заражения инфекционными агентами, включая репликационно-компетентный вирус; 2) вирусный вектор может

вызывать нежелательные клеточные последствия, например острые иммунные, воспалительные или нейротоксические ответы; 3) эффективное генетическое размножение вирусных векторов может ограничивать размер терапевтического груза и может потребовать генетических мотивов для регуляции репликации вектора.

5 Напротив, препараты невирусных ДНК-векторов на основе плазмид относительно недороги для очистки, в значительной степени неиммуногенны и не имеют жестких ограничений на последовательности, которые могут быть доставлены. Основные проблемы невирусных систем на основе плазмид заключаются в следующем: 1) низкие скорости доставки векторов к ядрам клеток-мишеней; 2) низкие скорости интеграции
10 трансгенов, как правило, с сопутствующими плазмидными последовательностями, которые имеют склонность к подавлению экспрессии; 3) интеграция множественных копий трансгена, что также может подавлять их экспрессию (Hackett P.V., et al. A transposon and transposase system for human application. *Molecular therapy*. 2010, 18(4): 674-683).

15 Указанные выше основные проблемы, связанные с невирусными векторами, можно преодолеть, используя систему на основе транспозазы SB (Sleeping Beauty). Эта система проста и не требует создания вирусных конструкций. Для обеспечения интеграции последовательности в геном необходимо наличие двух векторов, один должен содержать последовательность целевой встройки, фланкированной последовательностями IR/DR
20 (L/R), второй вектор должен обеспечивать синтез транспозазы SB. По увеличению активности фермента выделяют транспозазы SB10, SB11, SB100 и т.д. (Hackett P.V., et al. A transposon and transposase system for human application. *Molecular therapy*. 2010, 18(4): 674-683; Tipanee J. et al. Transposons: moving forward from preclinical studies to clinical trials. *Human Gene Therapy*. 2017, 28(11): 1087-1104). Достоинства систем на основе транспозазы:
25 биобезопасность, легкость в работе, длина встраиваемого фрагмента не ограничена, стабильная экспрессия встраиваемого гена.

Ближайшие аналоги. В работе (Оксанич А.С. и др. Конструирование плазмидного вектора для получения химерных антител заданной специфичности в клетках
30 млекопитающих. *Журн. микробиол.* 2017, 6:56-63) представлен универсальный плазмидный вектор, позволяющий получать полноразмерные химерные антитела различной специфичности различных классов и изотипов. Данный вектор создан на основе известного эукариотического плазмидного вектора pCI-neo и включает в себя сильный промотор CMV, гены устойчивости к антибиотикам, легкую и тяжелую цепи заданного антитела. Вектор прост в конструировании, для получения готовых
35 препаратов антител используются доступные и недорогие методики. Однако конечный выход антитела невелик (4 мг/л).

В международной заявке WO 2007/081336 описан вектор для получения рекомбинантных белков с высоким уровнем секреции. Достоинством данного изобретения является тройная лидерная последовательность, CMV промотор в
40 комбинации с регуляторным элементом elongation factor-1, что должно обеспечивать значительный уровень синтеза белка. Также вектор содержит PolyA, SV40 ori, SV40 PA, pUC Origin Site, гены устойчивости к антибиотикам ампициллин, неомицин. В описании изобретения отсутствуют данные о том, какой выход белка можно получить.

Недостатками приведенных выше изобретений является отсутствие цис-регуляторных элементов. При трансфекции клеток такими векторами последние хаотично
45 встраиваются в хромосому, конформация участка встройки значительно влияет на транскрипцию гена и его экспрессию. Цис-регуляторные элементы позволяют увеличить экспрессию гена без воздействия на структуру хроматина в регионе встройки. К цис-

регуляторным элементам относятся: locus control region (LCR), scaffold/matrix attachment region (S/MAR), insulator, ubiquitous chromatin open element (UCOE), anti-repressor (STAR element).

Наиболее близким аналогом (прототипом) является универсальный вектор, описанный в патенте Китая (CN 105255895, МПК C12N 15/85, опубл. 20.01.2016 г.). Авторы утверждают, что предложенная система экспрессии обеспечивает высокий выход белка, экспрессия является стабильной и длительной. Вектор создан на основе транспозазы SB, что позволяет легко интегрировать нужную последовательность в геном клетки. В качестве цис-регуляторного элемента выступает matrix attachment region - MAR2. Тяжелая и легкая цепи антитела соединены с помощью IRES. «Сайт внутренней посадки рибосомы» или «IRES» описывает последовательность, которая функционально обеспечивает инициацию трансляции и позволяет двум цистронам (открытым рамкам считывания) быть транслированными с одного транскрипта в животной клетке. Применение IRES элементов в векторных конструкциях описано ранее (Ramesh, N., et al. Nucl. Acids Res. 1996, 24: 2697-2700; Mosser, D.D. et al. BioTechniques. 1997, 22: 150-152). Для инициации транскрипции использовался цитомегаловирусный промотор CMV.

Однако, известный универсальный вектор-прототип обеспечивает синтез только полноразмерных антител, которые, как упоминалось ранее, по многим параметрам уступают антителам формата scFv-Fc.

Прототипом рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез антитела против вируса Эбола, является конструкция, описанная в патенте США (US 10640550, МПК А61Р 31/14, опубл. 05.05.2020 г.). Вектор, сконструированный в данной работе, содержит промотор с энхансером, IRES, PolyA, гены устойчивости к антибиотикам ампициллин, неомицин. Возможна интеграция генетического материала в геном с помощью системы на основе транспозазы. Нарботка антитела может осуществляться с помощью гибридной технологии, либо путем трансфекции эукариотических клеток с последующим выходом синтезированных антител в культуральную жидкость.

Недостатками данной конструкции является отсутствие цис-регуляторных элементов, необходимость встройки полноразмерных легкой и тяжелой цепей антитела. В описании вектора не указано какой промотор использовался для инициации транскрипции, отсутствуют данные о выходе целевого белка, что не позволяет судить об эффективности данной конструкции.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание универсального интеграционного вектора pVEAL и плазмидной генетической конструкции pVEAL-15742, обеспечивающей синтез и секрецию целевого белка - scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола (Anna Z. Wec, et al. Antibodies from a Human Survivor Define Sites of Vulnerability for Broad Protection against Ebolaviruses. Cell. 2017, 169(5): 878-890) в клетках млекопитающих CHO-K1, полученного с использованием указанного универсального вектора pVEAL, который лишен недостатков прототипа.

Указанный технический результат достигается тем, что универсальный интеграционный вектор pVEAL служит для создания целевых плазмидных конструкций, обеспечивающих синтез и секрецию scFv-Fc моноклональных антител, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 1 и содержит в соответствии с физической и генетической картой, представленной на Фиг. 1, следующие элементы:

- участок начала репликации ori (8616-9204);
- последовательности IR/DR (L/R), являющиеся частью системы на основе транспозазы SB100 (139-403, 7832-8127);
- последовательности UCOE, предотвращающих хромосомное «замалчивание»

рекомбинантной экспрессионной кассеты (416 - 1549, 6272-7820);

- CMV Enhancer (2108-2487), CMV промотор (2488-2699) - сильный наиболее часто используемый промотор в генно-терапевтических конструкциях;

- Chimeric intron (2860-2992), увеличивающий эффективность CMV промотора;

5 - лидерный пептид VI9, обеспечивающий экспорт белка из клетки (3114-3164);

- место для встройки вариабельных фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела, соединенных пептидным линкером, по сайтам гидролиза AfeI (3157), BamHI (3339);

- константную цепь антитела человека IgG1 (CH1-CH2-CH3) (3348-4031) с мутациями M252Y, S254T, T256E, E333A, H433K/N434F. Мутации увеличивают период полураспада антитела за счет взаимодействия с неонатальными рецепторами;

10 - участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (4046-4620);

- последовательность Bleo, кодирующую фактор устойчивости к антибиотику блеомицину (4625-4995);

15 - последовательность SV40 poly(A) signal, необходимую для стабилизации мРНК-транскриптов (5042-5163);

- SV40 промотор (5921-6262), обеспечивающий автономную репликацию в клетках млекопитающих, комбинация с CMV промотором существенно увеличивает выход белка;

20 - ген устойчивости к антибиотику ампициллин AmpR и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli (9375-10235).

Указанный технический результат достигается также тем, что плазмидная генетическая конструкция pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию целевого белка - scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола, имеет нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 2 и содержит в соответствии с физической и генетической картой, представленной на Фиг. 2, следующие элементы:

25 - участок начала репликации ori (8616-9204);

- последовательности IR/DR (L/R), являющиеся частью системы на основе транспозазы SB 100 (139-403, 8393-8688);

30 - последовательности UCOE, предотвращающих хромосомное «замалчивание» рекомбинантной экспрессионной кассеты (416 - 1549, 6833-8381);

- CMV Enhancer (2108-2487), CMV промотор (2488-2699) - сильный наиболее часто используемый промотор в генно-терапевтических конструкциях;

- Chimeric intron (2860-2992), увеличивающий эффективность CMV промотора;

35 - лидерный пептид VI9, обеспечивающий экспорт белка из клетки (3114-3164);

- ADI-15742-VH, последовательность, кодирующая вариабельный фрагмент тяжелой цепи антитела 15742 (3165-3533);

- ADI-15742-VK, последовательность, кодирующая вариабельный фрагмент легкой цепи антитела 15742 (3579-3903);

40 - константную цепь антитела человека IgG1 (CH1-CH2-CH3) (3909-4592) с мутациями M252Y, S254T, T256E, E333A, H433K/N434F. Мутации увеличивают период полураспада антитела за счет взаимодействия с неонатальными рецепторами;

- участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (4607-5181);

- последовательность Bleo, кодирующую фактор устойчивости к антибиотику блеомицину (5186-5556);

45 - последовательность SV40 poly(A) signal, необходимую для стабилизации мРНК-транскриптов (5603-5724);

- SV40 промотор (6482-6823), обеспечивающий автономную репликацию в клетках

млекопитающих, комбинация с CMV промотором существенно увеличивает выход белка;

- ген устойчивости к антибиотику ампициллин AmpR и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в *E.coli* (9936-10796).

Заявляемые плазмиды являются значительно усовершенствованными по сравнению с прототипами т.к. в качестве системы интеграции используется транспозаза SB 100, имеющая высокую активность фермента (Mates L et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet.* 2009, 41(6):753-61), имеются сильные цис-регуляторные элементы UCOE, предотвращающие хромосомное замалчивание (Neville JJ et al. Ubiquitous Chromatin-opening Elements (UCOEs): Applications in biomanufacturing and gene therapy. *Biotechnol Adv.* 2017, 35(5):557-564), комбинация CMV промотора с энхансером, интроном A и промотором SV40 существенно увеличивает выход белка (RU 2639519), сильный лидерный пептид V19, увеличивающий секрецию рекомбинантного белка (WO 2008/148519 A2), связанная посредством EMCV IRES соэкспрессия селекционного маркера Bleo и последовательностей антител может улучшить селекционный процесс (RU 2639519), scFv-Fc формат антител облегчает создание конструкции, упрощает схему получения и проверки необходимого антитела.

Изобретение иллюстрируется следующими графическими фигурами. На фиг. 1 представлена физическая и генетическая карта универсального интеграционного вектора pVEAL. На фиг. 2 представлена физическая и генетическая карта интеграционного вектора pVEAL со вставкой scFv-Fc антитела ADI-15742 против вируса Эбола - pVEAL-15742. На фиг. 3 представлено определение минимальной концентрации блеомицина, необходимой для гибели нетрансфицированной линии клеток-хозяев. На фиг. 4 представлен анализ нейтрализующей активности моноклонального scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола. На фиг. 5 представлен анализ культуральной среды штамма-продуцента scFv-Fc антитела 15742. На фиг. 6 представлен анализ препарата scFv-Fc антитела 15742 после хроматографии на белке A.

Для лучшего понимания сущности предлагаемого изобретения ниже приведены примеры (1-5) его осуществления. Все стандартные генно-инженерные и микробиологические манипуляции, а также амплификацию и секвенирование ДНК проводили по известным методикам (Маниатис Т., Фрич Э, Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование, М.: Мир, 1984; Клонирование ДНК. Методы. Под ред. Д. Гловера, Пер. с англ., Москва, Мир, 1988; Saiki R.K. et al. *Science.* 1988, 239(4839):487-491; Sanger F. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1977, 74:5463-5467).

Пример 1. Конструирование универсального интеграционного вектора pVEAL

Для проектирования вектора pVEAL-использовали акцепторный вектор pT2NB (Addgene plasmid # 26557). Интеграционный вектор был получен в несколько этапов. На первом этапе из вектора pT2NB при помощи сайт-направленного мутагенеза был удален сайт гидролиза BamHI. Для этого проводили ПЦР с использованием праймеров:

- pT2NB-F (5'-ggcgaattggagctcgggtccctata-3') и

- pT2NB-R (5'-aaaaaaGGTACCcgaggtcgtctctagctagaggaacc-3').

ПЦР фрагмента PCR-pT2NB проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг ДНК (плазмиды pT2NB), 10 пМ каждого праймера (pT2NB-F, pT2NB-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ,

дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C 30 с - 58°C, 45 с - 72°C (25 циклов); 120 с - 72°C.

5 Реакционную смесь, содержащую фрагмент PCR-pT2HB, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующую продукту амплификации - 709 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

10 Затем выделенный ПНР-продукт PCR-pT2HB и исходную плазмиду pT2HB обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Psp124VI и KpnI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 688 и 2859 п. н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

20 Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable с генотипом F' proA+B+lacIq Δ(lacZ)M15 zsf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 el4- Ф80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrg-hsdRMS-mcrBC), предоставленные производителем "Invitrogen" (США). Для этого к 100 мкл клеток добавляли 10 мкл лигазной смеси, инкубировали на льду в течение 40 минут. После этого клетки подвергали «температурному шоку» при 42°C в течение 40 сек. Охлаждали клетки на льду в течение 4 минут, затем добавляли по 200 мкл среды "SOC" (20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂) и инкубировали при 30°C в течение 60 минут. По окончании инкубации трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плазида pT2HB2.

40 Следующим шагом была встройка последовательностей UCSOE-R и UCSOE-L. Для получения последовательностей UCSOE-R и UCSOE-L использовали геномную ДНК человека. Для амплификации последовательности UCSOE-R была проведена ПЦР с помощью праймеров:

- 45 - UCSOE-R-F (5'-aaaaaCGGCCGGCCCTCCGCGCCTACAGC-3') и
 - UCSOE-R-R (5'-aaaaaaGGATCCCCGAGGAGACGCCGTGGC-3').

ПЦР фрагмента UCSOE-R проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг

ДНК (геномная ДНК человека), 10 пМ каждого праймера (UCOE-R-F, UCOE-R-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 5 30 с - 95°C, 30 с - 59°C, 95 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционную смесь, содержащую фрагмент UCOE-R, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК 10 полосы, соответствующую продукту амплификации - 1572 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» 10 фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Затем выделенный ПЦР-продукт UCOE-R обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BseX3I и BamHI, плазмиду pT2NB2 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BseX3I и BglII согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)).

15 Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 1555 и 3529 п. н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки 20 объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с 25 твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", 30 "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плазида pT2NB2-UCOE-R.

35 Амплификация последовательности UCOE-L была проведена при помощи ПЦР с использованием праймеров:

- UCOE-L-F (5'-AAGCTTcattggcGCCCTCCGCGCCTACAGC-3') и

- UCOE-L-R (5'-aaaaaaCGGCCGTGGCCActaatttGGATCCCCGAGGAG

40 ACGCCGTGGCC-3').

ПЦР фрагмента UCOE-L проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» 45 фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг ДНК (геномная ДНК человека), 10 пМ каждого праймера (UCOE-L-F, UCOE-L-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с - 59°C, 97 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционную смесь, содержащую фрагмент UCOE-L, разделяли электрофорезом в

1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосу, соответствующую продукту амплификации - 1593 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit»

5 фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.
Затем выделенный ПЦР-продукт UCOE-L и плазмиду pT2NB2-UCOE-R обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и BseXI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК

10 полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 1581 и 5051 п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

15 Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик

20 (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную

25 структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плазида pT2NB2-UCOE-RL.

Дальнейшее конструирование вектора заключалось во встройке последовательности V19-ADI (синтезирована по заказу ООО «ДНК-синтез»), кодирующей лидерный пептид

30 V19 и уникальные сайты гидролиза AfeI и BamHI, по которым будет проводиться вставка цепей необходимого антитела и scFV-Fc фрагмента.

Лигирование последовательности V19-ADI с коммерческим вектором pJet (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) проводили согласно инструкции производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма

35 NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при

40 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Получена конструкция pJet-V19-ADI.

Далее вставку последовательности V19-ADI проводили в вектор pCI-neo-hEST2 (#1781). Этот вектор был выбран, потому что содержит в своем составе сильный

45 эукариотический промотор CMV, а также набор генов устойчивости к антибиотикам, делающим его удобным для работы.

Вектор pCI-neo-hEST2 и pJet-V19-ADI обрабатывали эндонуклеазами рестрикции PspCI и SalI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)).

Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% и 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 5467 и 182 п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плазида pCI-neo-hEST2-V19-ADI.

Далее было проведено клонирование последовательности, кодирующей константную часть тяжелой цепи антитела человека (CH) Human IgG1 в вектор pCI-neo-hEST2-V19-ADI. Для амплификации последовательности, кодирующей константную часть тяжелой цепи антитела человека, использовали праймеры:

- Hinge_Bsp13I_F (5'-aaaaaaTCCGGAGACAAAАСТСАСАСАТGСССА С-3') и

CH3_SalI_R (5'-aaaaaaGTCTGACTCATTТACCCGGAGACAGGGAGA- 3').

В качестве ДНК матрицы использовали плазмиду pMAV-CH-100VH.

ПЦР фрагмента PCR-Human IgG1 проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг ДНК (pMAV-CH-100VH), 10 пМ каждого праймера (Hinge_Bsp13I_F, CH3_SalI_R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с - 60°C, 43 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционную смесь, содержащую фрагмент PCR-Human IgG1, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующую продукту амплификации - 708 п. н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Затем выделенный ПЦР-продукт PCR-Human IgG1 и плазмиду pCI-neo-hEST2-V19-ADI обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Bsp13I и SalI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 690 и 5635

п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

5 Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик
10 (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную
15 структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плаزمида pCI-neo-hEST2-V19-ADI-CN-21.

Далее проводилась встройка гена устойчивости к антибиотику блеомицину и последовательности EMCV IRES. Праймеры, используемые для амплификации:

20 - Bleo-scFv-F (5'-aaaccatggccaagttgaccag-3'),
- Bleo-scFv-R (5'-aaaaaaGCTAGCagcacgtgtcagtcctgctc-3').

ПЦР фрагмента PCR-Bleo-scFv проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала
25 2 мкг ДНК (FUGW, Addgene plasmid # 14883), 10 пМ каждого праймера (Bleo-scFv-F, Bleo-scFv-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с - 58°C, 25 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

30 Реакционную смесь, содержащую фрагмент PCR-Bleo-scFv, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосу, соответствующую продукту амплификации - 400 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit»
35 фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Затем выделенный ПЦР-продукт PCR-Bleo-scFv и плазмиду pJet-EMCV-IRES-V17-100VN-CN-2018 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Msp20I и AsuNI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты
40 разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 380 и 4578 п. н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

45 Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с

твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В результате была получена плазида pJet-IRES-Bleo.

ПЦР фрагмента EMCV-IRES-BleoR проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Праймеры, используемые для амплификации:

- IRES-scFv-R (5'-aaaaaaCTCGAGcggttcccgccctctccc-3') и
- IRES-Bleo-scFv-R (5'-aaaaaaGCGGCCGctcagtcctgctcctcggcc-3').

Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг ДНК (pJet-IRES-Bleo), 10 пМ каждого праймера (IRES-scFv-R и IRES-Bleo-scFv-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с - 58°C, 60 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционную смесь, содержащую фрагмент EMCV-IRES-BleoR, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосу, соответствующую продукту амплификации - 984 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Затем выделенный ПЦР-продукт EMCV-IRES-BleoR и плазмиду pCI-neo-hEST2-V19-ADI-CN-21 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI и NotI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 965 и 6300 п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). В

результате была получена плаزمида pCI-neo- hEST2-V19-ADI-CH-IRES-BLEO-21.

Последним шагом в получении целевого вектора pVEAL являлось объединение конструкций pT2HB2-UCOE-RL и pCI-neo- hEST2-V19-ADI-CH-IRES-BLEO-21. Плазмиду pT2HB2-UCOE-RL обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и Mox20I, плазмиду pCI-neo-scFv-ADI-CH-IRES-BLEO-21 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglIII и HpaI.

Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 6617 и 4297 п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик (ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск).

Встройка последовательностей переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей любого антитела в универсальный вектор pVEAL проводится по уникальным сайтам гидролиза AfeI и BamHI.

Пример 2. Получение генетической конструкции pVEAL-15742, кодирующей scFv-Fc антитело ADI-15742, для трансфекции линии клеток CHO-K1.

Для подтверждения эффективности универсального интеграционного вектора pVEAL проводили встройку переменных последовательностей тяжелой и легкой цепей антитела ADI-15742 и связывающего их sc-Fv фрагмента.

Для начала были амплифицированы тяжелая и легкая цепи антитела ADI-15742. ПЦР фрагмента PCR-ADI-15742VH проводилась с синтезированной последовательности ADI-15742VH (ООО «ДНК-синтез») с помощью праймеров:

- V19-ADI-F (5'-aaaaaacacgtgggaagccctggccccggccgccaccatgatgaggcccatcgtgctggtgctgctgttcgccacctcagcgtggccggcGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3') и
- V19-ADI-L-R (5'-cagagccgccgccgctaccaccaccaccAAGCTCACAGTGACCAGGG-3').

ПЦР фрагмента PCR-ADI-15742VK с синтезированной последовательности ADI-15742VK (ООО «ДНК-синтез») с помощью праймеров:

- V19-ADI-L-F (5'-tagcggcggcggcggctctggtggtggtgatccGATATTGTGCTGACACAGTCTCCT-3')и

- V19-ADI-R (5'-aaaaaaGTTCGACaactctctccggagccaccCTTGATTTCCAC
CTTGGTCCC-3').

ПЦР фрагментов PCR-ADI-15742VH, PCR-ADI-15742VK проводили с использованием ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционные смеси объемом 50 мкл содержали 2 мкг ДНК (ADI-15742VH/ ADI-15742VK), 10 пМ каждого праймера (V19-ADI-F, V19-ADI-L-R/ V19-ADI-L-F, V19-ADI-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с -58°C, 30 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционные смеси, содержащие фрагменты PCR-ADI-15742VH, PCR-ADI-15742VK, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие продуктам амплификации - 487 и 384 п. н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее был проведен отжиг и последующая амплификация последовательностей PCR-ADI-15742VH, PCR-ADI-15742VK с использованием праймеров V19-ADI-F и V19-ADI-R при помощи ПЦР-амплификатора «БИС» фирмы ООО БИС-Н (Россия). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 2 мкг ДНК каждого фрагмента (PCR-ADI-15742VH, PCR-ADI-15742VK), 10 пМ каждого праймера (V19-ADI-F и V19-ADI-R), 5 мкл 10xTaq буфера (фирмы Sibenzyme (Россия)), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ по 2,5 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq-SE фирмы Sibenzyme (Россия); реакцию осуществляли при следующих параметрах: 3 мин - 95°C; 30 с - 95°C, 30 с -58°C, 51 с - 72°C (30 циклов); 120 с - 72°C.

Реакционную смесь, содержащую амплифицированный фрагмент scFv-ADI-15742, разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующую продукту амплификации - 851 п.н., визуализированную при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Фрагмент выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Универсальный интеграционный вектор pVEAL и фрагмент scFv-ADI-15742 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции AfeI и BamHI согласно протоколу фирмы-производителя (Sibenzyme (Россия)). Рестрицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,4 мкг/мл). Для выделения ДНК полосы, соответствующие необходимым фрагментам - 10732 и 743 п.н., визуализированные при помощи ультрафиолета (УФ), вырезали из агарозного геля, помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Фрагменты выделяли из геля с помощью набора «Gel Extraction Kit» фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Далее проводили лигирование фрагментов ДНК-лигазой фага T4 (Sibenzyme (Россия)) в стандартном буферном растворе по методике производителя фермента. Полученной лигазной смесью трансформировали «компетентные» клетки E.coli штамма NEB Stable как было описано выше. Трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твердой питательной средой LB (среда LB с 1,5% агара), содержащей антибиотик

(ампициллин, 50-100 мкг/мл). Чашку Петри помещали в термостат на 18 часов при 30°C. Отдельные клоны трансформантов инокулировали в 5 мл питательного бульона LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл, наращивали 18 часов при 30°C и проводили выделение плазмидной ДНК при помощи наборов "Plasmid Mini Kit", "Qiagen" (Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Первичную структуру полученных плазмид подтверждали секвенированием. Секвенирование проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН (г.Новосибирск). В результате была получена плазида pVEAL-15742.

Пример 3. Получение клонов-продуцентов scFv-Fc антитела 15742

Для получения клеток продуцентов были выбраны клетки СНО-К1 (клон К1 линии СНО, выделенной из яичника китайского хомячка). Использование этих клеток опирается на опыт их коммерческого использования для создания продуцентов терапевтических белков, в том числе антител. Линия поддерживалась в среде на основе DMEM/F12 с добавлением 10% термоинактивированной (30 мин при температуре 56°C) фетальной сыворотки крови коров (FBS), L-глутамин. По достижении монослоя клетки пересаживались.

Для получения стабильной клеточной линии, синтезирующей рекомбинантный белок, определяли минимальную концентрацию селективного антибиотика блеомицина, необходимую для гибели нетрансфицированной линии клеток-хозяев. Для определения IC50 и IC100 блеомицина клетки рассаживали в 12-луночный культуральный планшет со средой DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной сыворотки крови коров (FBS) и L-глутамином, по достижении 90% конfluence монослоя производили замену культуральной среды на 2% DMEM/F12 с добавлением антибиотика блеомицина (50-700 мкг/мл). В течение 14 суток каждые 48-72 часов производили замену культуральной среды в лунках на 2% DMEM/F12 с добавлением блеомицина (50-700 мкг/мл).

При добавлении блеомицина чувствительные к нему клетки проявляли следующие морфологические изменения:

- Увеличение размера (аналогично воздействию цитомегаловируса, инфицирующего клетки)
- Аномальная форма клеток, включая появление длинных придатков
- Наличие больших пустых везикул в цитоплазме (пробой эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи)
- Разрушение плазмы и ядерной мембраны (появление множества отверстий в этих мембранах). В конце концов, клетки полностью разрушатся, и останется только клеточный «мусор».

Указанные изменения проиллюстрированы на фиг. 3. На фиг. 3а представлена фотография клеток, не подвергшихся воздействию блеомицина, - положительный контроль К+. На фиг. 3б - 3и представлены фотографии клеток, подвергшихся воздействию блеомицина в количестве от 50 до 700 мкг/мл. На данных фигурах показано, что при увеличении концентрации антибиотика клетки существенно меняются морфологически. На фиг. 3д при концентрации блеомицина 300 мкг/мл видно, что примерно половина клеток сохраняют жизнеспособность и присущую им морфологию. На фиг. 3е, 3ж клетки практически полностью погибли, преобладают измененные и разрушенные клетки.

Таким образом, установлена полуингибирующая и ингибирующая дозы блеомицина для СНО-К1 (IC50=325 мкг/мл, IC100=475 мкг/мл).

Для встройки экспрессионной кассеты проводили котрансфекцию методом катионно-липидной трансфекции (Lipofectamine 3000, Invitrogen) клеток СНО-К1 двумя плазидами.

Первая содержала последовательность scFv-Fc антитела 15742, pVEAL-15742, вторая содержала последовательность транспозазы SB100, pCMV(CAT)T7-SB100. После трансфекции инкубировали клетки 96 часов в CO₂-инкубаторе согласно рекомендациям производителя Lipofectamine 3000. Затем проводили замену среды на поддерживающую (с содержанием 2% фетальной бычьей сыворотки) с добавлением селективного антибиотика блеомицина (475 мкг/мл). Эту манипуляцию повторяли каждые 72-96 часов на протяжении 2-3 недель до тех пор, пока в отрицательном контроле клетки не погибли. Затем делали один пассаж на культуральных чашках и рассаживали в 96-луночные планшеты по одной клетке на лунку.

Получено 4 клона 15742 с нейтрализующим титром, определенным для IC₉₀, (анализировали культуральную среду) от 1:8 до 1:32768. Реакцию вируснейтрализации проводили на псевдовиральной системе.

Пример 4. Анализ нейтрализующей активности scFv-Fc моноклонального антитела ADI15742 против вируса Эбола

Препараты антитела 15742 титровали с шагом 4, инкубировали 30 мин в CO₂-инкубаторе со смесью псевдовиральных частиц вируса Эбола (50 мкл, физический титр 5×10^8 частиц) и переносили в 96-луночный плоскодонный планшет к суспензии культуры клеток НЕК293Т (50 мкл, 100 тыс/мл). Инкубировали 48 ч в CO₂-инкубаторе. По истечении времени из лунок планшета удаляли ростовую среду, промывали 100 мкл PBS, добавляли 40 мкл 1хлизирующего буфера (Promega, США), инкубировали 10 минут при комнатной температуре, суспендировали и переносили по 35 мкл в оптический планшет, добавляли 35 мкл LAR (Promega, США), и считывали результаты при помощи люцинометра (LuMate). Результаты анализа на примере одного из клонов представлены на фиг. 4. График, приведенный на фиг. 4, отражает зависимость нейтрализующей активности scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола, определенной для IC₉₀, от степени разведения препарата. При разведении 1:8 препарат антитела обладает стопроцентной нейтрализующей активностью. При разведении до 1:32768 нейтрализующая активность составляет 75%.

Пример 5. Нарботка и очистка scFv-Fc моноклонального антитела ADI15742

Каждый индивидуальный клон-продуцент рекомбинантного scFv-Fc антитела 15742 нарабатывался в культуральной среде DMEM/F12 с 10% содержанием фетальной телячьей сыворотки. Культивирование клонов-продуцентов проводилось в объеме 200 мл в роллерных бутылках при 37°C в течение 10 суток. Затем среда заменялась на поддерживающую, содержащую 2% фетальной телячьей сыворотки. Культивирование продолжали до тех пор, пока клетки сохраняли жизнеспособность. Далее полученную культуральную жидкость сливали, осаждали клеточный дебрис при помощи центрифугирования при 6000 g, 4°C в течение 15 мин.

Очистку рекомбинантных антител проводили при помощи аффинной хроматографии с использованием сорбента, содержащего на своей поверхности белок А (MabSelect SuRe, GE Healthcare, США), и хроматографической системы АКТАprime plus (GE Healthcare, США). Очистка включает в себя следующие стадии: уравнивание хроматографической колонки, нанесение образца, промывка колонки, элюция белка.

Уравнивание хроматографической колонки включает в себя промывание пятикратным объемом базового буфера (50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,0-7,2). Скорость потока определялась временем контакта буфера с сорбентом, время контакта составляло не менее 4 мин.

Далее наносили культуральную жидкость, содержащую антитела, на колонку, время контакта образца с сорбентом составляло не менее 5 мин.

Отмывку колонки от несвязавшихся белков, а также от белков, обладающих низкой силой взаимодействия с сорбентом, проводили при помощи последовательной промывки хроматографической колонки базовым буфером и буфером для промывки (20 мМ Трис-НСl, рН 6,8-7,0). Объемы базового и промывочного буферов составляли 3,5 объема колонки. Скорость потока определялась временем контакта буфера с сорбентом, время контакта составляло не менее 3,5 мин.

Элюцию проводили пятикратным объемом элюирующего буфера (100 мМ Глицин-НСl, рН 3,4-3,5). Скорость потока определялась временем контакта буфера с сорбентом, время контакта составляло не менее 6 мин. Полученные образцы нейтрализовали до рН 7,0 при помощи буфера для титрования (1М Трис). Полученные препараты анализировали при помощи разделения в полиакриламидном геле (ПААГ) по стандартной методике (Фиг. 5). Препараты, нанесенные на ПААГ: дорожка 1 - исходная культуральная жидкость, содержащая наработанное антитело, до очистки на хроматографической колонке, 10 мкл; дорожка 2 - культуральная жидкость, прошедшая через хроматографическую колонку, и содержащая несвязавшиеся с сорбентом клеточные белки, 10 мкл; дорожка 3 - препарат после промывки колонки уравнивающим буфером, содержит слабо связавшиеся с сорбентом клеточные белки, 10 мкл; дорожка 4 - препарат после промывки колонки буфером для промывки, содержит остатки несвязавшихся белков, 10 мкл; 5 - маркер длин белков 10-260 kDa; дорожка 6 - препарат антитела 15742 после очистки, 10 мкл. На представленной электрофореграмме видно, что полученное антитело очищено от посторонних белков, имеет массу порядка 50 kDa.

Препараты, содержащие рекомбинантное антитело, фильтровали от выпавших в осадок белков при помощи насадки на шприц с диаметром пор 0,22 мкм (TRP, Швейцария). Элюаты концентрировались при помощи центрифугирования препаратов антитела в концентраторах (Sartorius AG, Германия) при 6000 g, 17°C. Концентрация антител определялась с помощью прибора для определения сверхмалых концентраций NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия) согласно инструкции производителя. Контроль проводили при помощи разделения в ПААГ. Пример определения концентрации препарата очищенного scFv-Fc антитела 15742, полученного с одного из клонов-продуцентов, приведен на фиг. 6. Для определения приблизительной концентрации разводили препараты очищенного scFv-Fc антитела 15742 в 10, 20, 40, 80 раз и сравнивали с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в концентрации от 0,025 до 1 мкг. Препараты, нанесенные на ПААГ: дорожка 1 - препарат очищенного антитела 15742 после концентрирования в 1-кратном разведении (выделение из 1 л культуральной среды), 10 мкл; дорожка 2 - препарат очищенного антитела 15742 до концентрирования в 10-кратном разведении (выделение из 1 л культуральной среды), 10 мкл; дорожка 3 - препарат очищенного антитела 15742 до концентрирования в 20-кратном разведении (выделение из 1 л культуральной среды), 10 мкл; дорожка 4 - препарат очищенного антитела 15742 до концентрирования в 40-кратном разведении (выделение из 1 л культуральной среды), 10 мкл; дорожка 5 - препарат очищенного антитела 15742 до концентрирования в 80-кратном разведении (выделение из 1 л культуральной среды), 10 мкл; дорожка 6-маркер длин белков 10-260 kDa; 7 - БСА - 1 мкг; 8 - БСА - 0,1 мкг; 9 - БСА - 0,05 мкг; 10 - БСА - 0,025 мкг. При сопоставлении концентраций scFv-Fc антитела 15742 и БСА сделан вывод, что концентрация целевого белка, полученная с одного из клонов-продуцентов, составляет примерно 150 мг/л.

Анализ культуральной жидкости различных клонов-продуцентов показал, что наработка антител у них идет неравномерно. Содержание антител в препаратах после

хроматографии и концентрирования варьируется в пределах от 35 мг до 150,6 мг с одного литра культуральной жидкости.

Список последовательностей:

5 <110> Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

10 <120> Универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плазмида pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антитела ADI-15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих и полученная с использованием вектора pVEAL

<160> SEQ ID NO 2

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 10914

15 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Нуклеотидная последовательность универсального интеграционного вектора pVEAL

<400> 1

20 1 caagcgcgatt aagtgggta acgccagggt ttcccgatc acgacgttg aaaacgcagg
61 ccagtgcgc cgcgtaatac gactcactat agggcgaatt ggagctcggg tcctataca
121 gttgaagtcg gaagttaca tacacttaag ttggagtcac taaaactcgt tttcaacta
181 ctccacaat ttctgtaa caacaatag tttggcaag tcagttagga catctacttt
241 gtcatgaca caagtcattt ttccaacaat tgttacaga cagattatt cactataat
25 301 tctactgac acaattccag tgggtcagaa gttacatac actaagtga ctgtgccttt
361 aacagcctg gaaaattcca gaaaatgatg tcatggcttt agaagctca ttggcgcctt
421 ccgcgcctac agctcaagcc acatccgaag ggggaggagg ccgggagctg cgcgcggggc
481 cgcggggggg aggggtggca ccgccacgc cgggaggcca cgaagggtgg gcagcggggc
541 gcgcgcgcgg cggggggagg ggccggcgcc gcgcccgtg ggaattgggg ccctaggggg
30 601 agggcggagg cgcgcacgc cgcggcactt accgttcgcg gcgtggcgcc cgggtgctcc
661 caaggggagg gaagggggag gcggggcgag gacagtacc ggagtctct cagcgggtggc
721 tttctgctt ggcagcctca gcggtggcg ccaaaaccgg actccgcca ctctctgcc
781 cgcgggtgag aggggtgga atcctcaga cgtggggga gggggagttg ggagctaaa
841 aactagtacc ctttgggac cacttcagc agcgaactct cgttacacc aggggtcagt
35 901 tccacagacg cgggccaggg gtgggtcatt gcggcgtgaa caataattg actagaagt
961 gattcgggtg ttccggaag gggccgagtc aatccgccga gttggggcac gaaaacaaa
1021 aagggaggc tactaagatt tttcggcg gggttatcat tggcgtact gcagggacca
1081 cctcccgggt tgagggggct ggatccag gctgcggatt aagcccctcc cgtcggcgtt
1141 aattcaaac tgcgcgactt ttctacctg ccttcgcaa ggcaggggcc gggaccctat
40 1201 tccaagaggt agtaactagc agactctag cctccgcaa ttcattgagc gcattacgg
1261 aagtaacgtc gggactgtc tctggccgca aggggtggag gactacgcat ttggcgtaac
1321 gtggggcgta gagcctccc gccattggcg gcggataggc cgttacgcg acggcctgac
1381 gtacgggaag acgcttagt ggggggggaa gttctagaaa agcggcggca gcggtctag
1441 cggcagtagc agcagcgccg ggtcccgtgc ggaggtgctc ctgcagagt ttttctcca
45 1501 gcagcggcag ttctactac agcggcagga cgagtcgggt tegtgtctg ccgcggagat
1561 ctctctcctc tegtctggct gcgggaaatc gggctgaagc gactgagtc gcgatggagg
1621 taacgggttt gaaatcaatg agttattgaa aagggcatgg cgaggccgtt ggcgcctcag
1681 tggaagtcgg ccagccgctt ccgtgggaga gaggcaggaa atcgaccgaa ttcagtagca

1741 gtggggctta aggtttatga acgggggtctt gagcggaggc ctgagcgtac aaacagcttc
 1801 cccacctca gcctcccggc gccattccc ttcactgggg gtgggggatg gggagcttc
 1861 acatggcgga cgctgccccg ctgggggtgaa agtggggcgc ggaggcggga ctcttattc
 1921 ctttctaaa gcacgtgct tcgggggcca cggcgtctcc tcggggatct tcaatattgg
 5 1981 ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta ttggccattg
 2041 catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc aatatgaccg
 2101 ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagt
 2161 catageccat atatggagt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
 2221 ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgtcccat agtaacgcca
 10 2281 atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccactggca
 2341 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg
 2401 cccgctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg gcagtacac
 2461 tacgtattag tcatcgtat taccatgggtg atgcggttt ggcagtacac caatggcgt
 2521 ggatagcggg ttgactcagc gggattcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt
 15 2581 ttgtttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgac gtaacaactg cgatcggccg
 2641 ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc
 2701 gtttagtga cgcagacac actagaagct ttattgcggg agtttatcac agttaaattg
 2761 ctaacgcagt cagtgtctt gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt gactctctta
 2821 aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgagc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga
 20 2881 caggttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact ctgctgttc
 2941 tgataggcac ctattgtct tactgacac cactttgct ttctctccac aggtgtccac
 3001 tccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaac acgactcact ataggctagc
 3061 ctgagaatt cgtctgctg cgcacgtggg aagcctggc cccggccgc accatgatga
 3121 ggcccatcgt gctggtgctg ctgttcgcca cctcagcgt ggccggcgag tgcgagtgcg
 25 3181 agtgcgagtc gtacgtacgt acgtacgtac gtacgtatat atatatatat attatatata
 3241 ttaatatatg gcgagtgcga gtgcgagtgc gagtcgtacg tacgtacgta cgtacgtacg
 3301 tatatatata tatatattat atatattaat atatatatgg atccggagac aaaactcaca
 3361 catgcccacc gtgcccagca cctgaaactc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc
 3421 caaaaccaa ggacaccctc tacatcacc gggaacctga ggtcacatgc gtggtggtgg
 30 3481 acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc
 3541 ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg
 3601 tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca
 3661 acaaagecct cccagcccc atcgcgaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag
 3721 aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac caggtcagcc
 35 3781 tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg
 3841 ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctctctt
 3901 tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtctctcat
 3961 gctccgtgat gcatgaggct ctgaagtcc actacagca gaagagcctc tcctgtctc
 4021 cgggtaaatg agtcgagcgg tccccccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc
 40 4081 cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata tgttatttc caccatattg
 4141 ccgtctttg gcaatgtgag ggccccgaaa cctggcctg tcttctgac gagcattct
 4201 aggggtcttt cccctctgc caaaggaatg caaggtctgt tgaatgtcgt gaaggaagca
 4261 gtctctgag aagcttctg aagacaaaca acgtctgtag cgacccttg caggcagcgg
 4321 aacccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc cacgtgtata agatacact
 45 4381 gcaaaagcgg cacaaccca gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa
 4441 tggctcact caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg cccagaaggt accccattgt
 4501 atgggatctg atctggggc tcggtgcaca tctttacat gtgttagtc gaggttaaaa
 4561 aacgtctagg cccccgaac cacggggacg tggtttctt ttgaaaaaca cgatgataat

4621 atggccaagt tgaccagtgc cgttccgggtg ctcaccgcgc ggcacgtcgc cggagcggtc
 4681 gagttctgga ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcgccgggt
 4741 gtggtccggg acgacgtgac cctgttcac agcgcgggtcc aggaccaggt ggtgccggac
 4801 aacacctggt cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tgtacgccga gtggtcggag
 5 4861 gtcgtgtcca cgaactccg ggacgcctcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag
 4921 ccgtggggggc gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc
 4981 gaggagcagg actgagcggc cgcttccctt tagtgagggt taatgcttcg agcagacatg
 5041 ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt
 5101 atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca
 10 5161 gtaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcagggtc aggggggagat gtgggaggtt
 5221 ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggct
 5281 ggcgtaatag cgaagagcc cgcaccgatc gcccttccca acagtgcgc agcctgaatg
 5341 gcgaatggac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag
 5401 cgtgaccgct aacttgcca gcgccctagc gcccgctct ttcgctttct tcccttctt
 15 5461 tctcgccacg ttcgccggtt ttccccgta agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt
 5521 ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaact gattaggggtg atggttcacg
 5581 tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg acgttgaggt ccacgttctt
 5641 taatagtgga ctctgttcc aactggaac aactcaac cctatctcgg tctattctt
 5701 tgattataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca
 20 5761 aaaatttaac gcgaattta acaaaatatt aacgcttaca atttctgat gcggtatttt
 5821 ctcttacgc atctgtcggg tatttcacac cgcatacgc gatctgcgc gcaccatggc
 5881 ctgaaataac ctctgaaaga ggaacttggg taggtacct ctgaggcggg aagaaccagc
 5941 tgtggaatgt gtgtcagttt ggggtgtgaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta
 6001 tgcaaagcat gcattcctat tagtcagcaa ccaggtgtgg aaagtcccc ggctccccag
 25 6061 caggcagaag tatgcaaagc atgcattcctc attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa
 6121 ctccgcccac ccgccccca actccgccca gttccgccca ttctccgcc catggtgac
 6181 taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt
 6241 agtgaggagg cttttttgga ggccacggcc ggccctcgc gcctacagct caagccacat
 6301 ccgaagggggg agggagccgg gagctgcgcg cggggccgcc ggggggaggg gtggcaccgc
 30 6361 ccacgccggg cggccacgaa gggcggggca gcgggcgcgc gcgcggcggg gggagggggc
 6421 ggcgccgcgc ccgctgggaa ttggggccct aggggggaggg cggaggcgc gacgaccgcg
 6481 gcacttaccg ttcgcggcgt ggcgcccggt ggtccccaa gggaggggag ggggagggcg
 6541 ggcgaggaca gtgaccggag tctctcagc ggtggtttt ctgcttgca gcctcagcg
 6601 ctggcgccaa aaccggactc cggccactc ctgcgccgc ggtgcgaggg tgtggaatc
 35 6661 tccagacgct gggggagggg gagttgggag ctaaaaaact agtaccctt tgggacct
 6721 ttcagcagc aactctctg tacaccagg gtcagttcca cagacgcggg ccaggggtg
 6781 gtcattgagg cgtgaacaat aattgacta gaagtgtatt cgggtgttc cggaaagggc
 6841 cgagtcaatc cggcagttg gggcacggaa acaaaaagg gaaggctact aagattttc
 6901 tggcgggggt tatcattggc gtaactgcag ggaccactc ccgggttgag ggggctggat
 40 6961 ctccaggctg cggattaagc ccctcccgc ggcgtaatt tcaactgcg cgactttct
 7021 cacctgcctt ccgaaggca ggggccggga ccctattcca agaggtagta actagcagga
 7081 ctctagcctt ccgaattca ttgagcgcatt ttacggaagt aacgtcgggt actgtctctg
 7141 gccgcaaggg tgggaggagt acgatttgg cgtaaaggtg ggcgtagagc ctccccca
 7201 ttggcggcgg ataggcggtt tacgcgacgg cctgacgtag cggaaagacgc cttagtgggg
 45 7261 gggaaaggtc tagaaaagc gcggcagcgg ctctagcggc agtagcagca gcgccgggtc
 7321 ccgtgcggag gtgctcctc cagagttgtt tctccagcag cggcagttct cactacagc
 7381 ccaggagcag tccggttctg gttcgtccgc ggagatctct ctatctcgc tcggctcgg
 7441 gaaatcgggc tgaagcagc gagtccgcga tggaggtaac gggtttgaat tcaatgagt

7501 attgaaaagg gcatggcgag gccgttgccg cctcagtga agtcggccag ccgcctccgt
 7561 gggagagagg caggaatcg gaccaattca gtagcagtgg ggcttaaggt ttatgaacgg
 7621 ggtcttgagc ggaggcctga gcgtacaaac agcttccca cctcagcct cccggcgcca
 7681 tttccctca ctgggggtgg gggatgggga gctttacat ggcggacgct gccccgctgg
 5 7741 ggtgaaagtg gggcgcgagg gcgggacttc ttattccctt tctaaagcac gctgcttcgg
 7801 gggccacggc gtctcctcgg ggatctagct tgtggaagge tactcgaat gtttgacca
 7861 agttaacaa tttaaaggca atgctacaa atactaattg agtgtatgta aacttctgac
 7921 ccaactggaa tgtgatgaaa gaaataaaag ctgaaatgaa tcattctctc tactattatt
 7981 ctgatattc acattctta aataaagtgg tgatcctaac tgacctaaaga cagggaaatt
 10 8041 ttactaggat taaatgtcag gaattgtgaa aaagtgagt taaatgtatt tggctaaggt
 8101 gtatgtaaac ttccgacttc aactgtatag ggcttctcta gctagagacg acctcgggta
 8161 cccagctttt gtcccttta gtgagggtta attgcgcgct tggcgtaac atggtcatag
 8221 ctgttctctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc
 8281 ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc
 15 8341 tcaactcccg cttccagtc gggaaactcg tegtccagc tgcattaatg aatcggcca
 8401 cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgtcttccg ctctcctcct cactgactcg
 8461 ctgcgctcgg tegtccgct cgcggcagcg gtatcagctc actcaaagge ggtaatacgg
 8521 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag
 8581 gccaggaacc gtaaaaagge cgcgttctg gcgttttcc ataggctccg cccccctgac
 20 8641 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga
 8701 taccaggcgt tccccctgg aagctcctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgcccgtt
 8761 accggatacc tctccgctt tctccctcg ggaagcgtgg cgttttctca tagctcacgc
 8821 ttaggtatc tcaattcgtt gtaggtcgtt cgtccaagc tgggtgtgt gcacgaacc
 8881 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta
 25 8941 agacagact tatgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat
 9001 gtaggcgggt ctacagagtt ctgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca
 9061 gtatttgta tctgcgctc gctgaagcca gttacctc gaaaaagagt tggtagctc
 9121 tgatccgca acaaaaccac cgtcgttagc ggtggtttt ttgttgcaa gcagcagatt
 9181 acgpcagaa aaaaggatc tcaagaagat ctttgatct ttctacggg gtctgacgt
 30 9241 cagtggaacg aaaactcag ttaaggatt ttggtcatga gattatcaa aaggatctc
 9301 acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt ttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa
 9361 acttgctc acagttacca atgcttaate agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta
 9421 ttcgttcat ceatagttgc ctgactccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc
 9481 ttaccatctg gccccagtc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat
 35 9541 ttatcagca taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgtcc tgcaacttta
 9601 tccgctcca tccagtctat taattgttc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagt
 9661 aatagtttc gcaacgtgtg tgcattgct acaggcatc tgggtcagc ctgctcgtt
 9721 ggtatggctt cactcagctc cgttcccaa cgtcaagge gagttacatg atccccatg
 9781 tgtgcaaaa aagcggtag ctcttcggt cctccgatc ttgcaagaag taagtggcc
 40 9841 gcagtgtat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctctactgt catgcatcc
 9901 gtaagatct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg
 9961 cggcgaccga gttgctctg cccggcgta atacgggata ataccgcgcc acatagcaga
 10021 actftaaaag tgctcatcat tggaaaactg tctcggggc gaaaactctc aaggatctta
 10081 ccgctgttga gatccagtc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct
 45 10141 tttacttca ccagcgttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaag
 10201 ggaataaggg cgacacggaa atgtgaata ctactactct tcttttca atattattga
 10261 agcattatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat
 10321 aaacaaatag gggttccg cactttccc gaaaagtgc cacctgacgc gcctgtagc

10381 ggcgcattaa ggcggcgggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccage
 10441 gccctagecg cegctccttt cgtttcttc ccttccttc tcgccacgtt cgccggcttt
 10501 ccccgtaag ctctaaatcg ggggctcct ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac
 10561 ctcgacccca aaaaacttga ttaggggat ggtcacgta gtgggccatc gccctgatag
 5 10621 acggttttc gcccttgac gttggagtcc acgttctta atagtggact ctgttccaa
 10681 actggaacaa cactcaacce tatctcggtc tattctttg atttataagg gattttgccg
 10741 attcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaatttaac
 10801 aaaaattaa cgcttacaat ttccatcgc cttcaggct gcgcaactgt tgggaagggc
 10861 gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctg
 10 <210> SEQ ID NO: 2
 <211> 11475
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Нуклеотидная последовательность рекомбинантной плазмиды pVEAL-15742,
 15 обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антитела ADI-15742 против
 вируса Эбола.
 <400> 2
 1 caagcgatt aagtgggta acgccagggt ttccacgac acgacgttgt aaaacgacgg
 61 ccagtgageg cgcgtaatac gactcactat agggcgaatt ggagctcggg tcctataca
 20 121 gttgaagtcg gaagttaca tacacttaag ttggagtcac taaaactcgt tttcaacta
 181 ctccacaaa ttctgttaa caaacaatag tttggcaag tcagttagga catctacttt
 241 gtcatgaca caagtcatt ttccaacaat tgtttacaga cagattatt cactataat
 301 tcaactgac acaattccag tgggtcagaa gttacatac actaagtga ctgtgccttt
 361 aaacagcttg gaaaattcca gaaaatgat tcatggcttt agaagctca ttggcgccct
 25 421 ccgcgcctac agctcaagcc acatccgaag ggggagggag ccgggagctg cgcgcggggc
 481 cgcggggggg aggggtggca ccgccacgc cggcgggcca cgaagggcgg gcgacggggc
 541 gcgcgcggcg cggggggagg ggcggcgccc gcgcccgtg ggaattgggg ccctaggggg
 601 agggcggagg cggcagcagc cgcggcactt accgttcgcg gcgtggcgcc cgggtgctcc
 661 caaggggagg gaagggggag gcggggcgag gacagtgacc ggagtctct cagcgggtggc
 30 721 tttctgctt ggcagctca gcggtggcg ccaaaaccgg actccgcca ctctcggc
 781 cgccggtgcg aggggtgga atcctcaga cgctggggga gggggagttg ggagcttaa
 841 aactagtacc ctttgggac cacttcagc agcgaactct cctgtacacc aggggtcagt
 901 tccacagacg cgggccaggg gtgggtcatt gcggcgtgaa caataattg actagaagt
 961 gattcgggtg ttccggaag gggccgagc aatccgccga gttggggcac gaaaacaaa
 35 1021 aaggggaagc tactaagatt tttctggcgg gggttatcat tggcgtact gcagggacca
 1081 ctccccgggt tgagggggct ggatctccag gctgcggatt aagcccccc cgtcggcgtt
 1141 aattcaaac tgcgcgacgt ttctacactg cttcggcaa ggcaggggcc gggaccctat
 1201 tccaagaggt agtaactagc aggactctag cttccgcaa ttcattgagc gcatttacgg
 1261 aagtaacgic gggfactgic tctggccgca aggggtggag gactacgcat ttggcgtaa
 40 1321 gtggggcgta gagccttccc gccattggcg gcggataggg cgtttacgcg acggcctgac
 1381 gtageggaag acgccttagt ggggggggaa gttctagaaa agcggcgcca gcggctctag
 1441 cggcagtagc agcagcgccc ggtcccgtgc ggaggtgctc ctgcagagt tgtttctca
 1501 gcagcggcag ttctactac agcggcagga cgagtccggt tegtgttct cgcgggat
 1561 ctctctcacc tcgtcggct gcgggaaatc gggctgaagc gactgagtcc gcgatggagg
 45 1621 taacgggttt gaaatcaatg agttattgaa aagggcatgg cgaggccgtt ggcgcctcag
 1681 tggaagtcgg ccagccgct cegtgggaga gaggcaggaa atcggacaa ttcagttagca
 1741 gtggggctta aggtttatga acggggtctt gagcggaggc ctgagcgtac aaacagcttc
 1801 cccacctca gcctccggc gccatttccc ttactgggg gtgggggatg gggagcttc

1861 acatggcggga cgctgccccg ctgggggtgaa agtggggcgc ggaggcggga cttcttatto
 1921 ctttctaaa gcacgtgct tcgggggcca cggcgtctcc tcggggatct tcaatattgg
 1981 ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta ttggccattg
 2041 catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc aatatgaccg
 5 2101 ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt
 2161 catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga
 2221 ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgtcccat agtaacgcca
 2281 atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaacgtc ccacttggca
 2341 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg
 10 2401 cccgcctggc attatgcccga gtacatgacc ttacgggact ttctacttg gcagtacac
 2461 tacgtattag tcctcgtat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac caatgggctg
 2521 ggatagcggg ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt
 2581 ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgct gtaacaactg cgatcggccc
 2641 ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata agcagagctc
 15 2701 gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac agttaaattg
 2761 ctaacgcagt cagtgtctt gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt gactctctta
 2821 aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga
 2881 caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc
 2941 tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgect ttctctccac aggtgtccac
 20 3001 tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaac acgactcact ataggctagc
 3061 ctcgagaatt cgtctcgtc cgcacgtggg aagccctggc cccggccgccc accatgatga
 3121 ggcccatcgt gctggtgctg ctgttcgcca cctcagcgtc ggccggcgag gtgcagctgg
 3181 tggagtccgg gggaggcttg gtacagccgg gggggctcct gagactctcc tgtgcagcct
 3241 ctggattcac ctttagcagc tatgcatga gctgggtccg ccaggctcca gggaaaggggc
 25 3301 tggagtgggt ctccgaaatt agcgggtcttg gtggtagcac atactacgca gactccgca
 3361 agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagagcac cctgtatctg caaatgaaca
 3421 gcctgagagc cgaagacacg gccgtatatt actgtgcgaa agatcatcgc gtttgggcac
 3481 ctggatatta ctttgaccac tggggccagg gaacctggt cactgtgagc tctggtggtg
 3541 gtggtagcgg cggcgggcgc tctggtggtg gtggttccga tattgtgctg acacagtctc
 30 3601 ctccaccct gtctgcatct gtcggagaca gattcaccat cacttgccgg gccagtcaga
 3661 gtattagtag ctggttggcc tggatcagc agaaaccagg gaaagcccct aaactcctga
 3721 tctatgatgc ctccagtttg gaaagtgggg tccatcaag gttcagcggc agtggatctg
 3781 ggacagagtt cactctcacc atcagcagcc tgcagcctga tgattttgca acttattct
 3841 gccaacagta taataggtcc cccactttcg gcggaggac caaggtggaa atcaagggtg
 35 3901 gatccggaga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac
 3961 cgtcagctt cctctcccc caaaacceca aggacacct ctacatcacc cgggaacctg
 4021 aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacce tgaggtcaag ttaactggt
 4081 acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca
 4141 gcactgaccg tgtgtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg
 40 4201 agtacaagt caaggtctcc acaaagccc tccagcccc catcgcgaaa accatctcca
 4261 aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg gtacacctc gcccctacc cgggaggaga
 4321 tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg
 4381 ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc
 4441 tggactccga cggctcctc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc
 45 4501 agcaggggaa cgtcttctca tctccctga tgcattgagc tctgaagttc cactacacgc
 4561 agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gattcgagcg gttcccgcct ctctccctcc
 4621 cccccctca acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag gccggtgtgc gtttctctat
 4681 atgttatttt ccacatatt gccgtctttt ggcaatgtga gggcccggaa acctggccct

4741 gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt tcccctctcg ccaaaggaat gcaaggtctg
 4801 ttgaatgtcg tgaaggaage agttctctg gaagcttctt gaagacaaac aacgtctgta
 4861 gcgacccttt gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca ggtgcctctg cggccaaaag
 4921 ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc agtgccacgt tgtgagtgg
 5 4981 atagttgtgg aaagagtcaa atggctcacc tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat
 5041 gccagaagg tacccattg tatgggatct gatctggggc ctcggtgcac atgctttaca
 5101 tgtgtttagt cgaggttaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggtttcc
 5161 tttgaaaaac acgatgataa tatggccaag ttgaccagtg ccgttccggg gctcaccccg
 5221 cgcgacgtcg ccggagcggg cgagttctgg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc
 10 5281 gtggaggagc acttcgccgg tgtggtccgg gacgacgtga cctgtttcat cagcgcggtc
 5341 caggaccagg tgggtccgga caacacctg gcctgggtgt ggggtgcgcg cctggacgag
 5401 ctgtacccg agtggtcgga ggtcgtctc acgaacttc gggacgcctc cgggccggcc
 5461 atgaccgaga tcggcgagca gccgtggggg cgggagttcg cctgcgcga cccggccggg
 5521 aactgcgtgc acttcgtggc cgaggagcag gactgagcgg ccgcttccct ttagtgaggg
 15 5581 ttaatgctc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga
 5641 atgcagtga aaaaatgctt tattgtgaa attgtgatg ctattgctt atttgaacc
 5701 attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcagggt
 5761 caggggggaga tgtgggaggt ttttaaac aagtaaaacc tctacaaatg tggtaaaac
 5821 cgataaggat cgatccgggc tggcgttaata gcgaagagc ccgcaccgat cgccttccc
 20 5881 aacagttcgc cagcctgaat ggcgaatgga cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc
 5941 ggggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccg tacacttgc agcgcctag cgcctctc
 6001 ttcgcttc tcccctct tctcggccac gttcggcggc tttcccctc aagctctaa
 6061 tcgggggctc cctttagggt tccgatttag tctttacgg cacctcgacc caaaaaact
 6121 tgattagggt gatggttac gtagtgggccc atcgccctga tagacggtt ttcgccctt
 25 6181 gacgttgag tccacttct ttaatagtg actctgttc caaactggaa caaactcaa
 6241 cctatctcg gtctattct ttgattata agggatttg ccgatttcgg cctattggt
 6301 aaaaatgag ctgattaac aaaaattaa cgcgaattt aacaaatat taacgcttac
 6361 aatttctga tgcgtattt tctcttacg catctgtcg gtatttaca ccgcatacgc
 6421 ggatctcgc agcaccatgg cctgaaataa cctctgaaag aggaacttg ttaggtacct
 30 6481 tctgagcgg aaagaaccag ctgtggaatg tgtgtcagtt aggtgtgga aagtccccag
 6541 gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcactcaa ttatcagca accaggtgtg
 6601 gaaagtccc aggtcccga gcaggcagaa gtatgaaag catgcctc aattatcag
 6661 caacatagt cccgcccta actccgcca tcccacct aactccgcc agttccgcc
 6721 attccgcc ccatggctga ctaattttt ttattatgc agaggccgag gccgcctcg
 35 6781 cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctttttgg aggccacggc cggccctccg
 6841 cgcctacgc taaagccaca tccgaagggg gagggagccg ggagctcgc gcggggccgc
 6901 cggggggagg ggtggcaccg ccacgccgg gcggccacga agggcggggc agcgggcccg
 6961 cgcgcccgg ggggaggggc cggcggcgg cccgctggga attggggccc tagggggagg
 7021 gcggagcgc cgacaccgc ggcacttacc gttcggcggc tggcggccgg tggccccaa
 40 7081 ggggagggaa gggggaggcg gggcgaggac agtgaccgga gtctctcag cgggtgctt
 7141 tctgcttggc agctcagcg gctggcgcca aaaccggact ccgccactt cctcggccc
 7201 cgtgcgagg gtgtggaatc ctccagacgc tgggggaggg ggagttggga gcttaaaac
 7261 tagtaccct ttggaccac ttcagcagc gaactctct gtacaccagg ggtcagttc
 7321 acagacgcgg gccaggggtg ggtcattcg gcgtgaacaa taattgact agaagttgat
 45 7381 tcgggtgtt ccggaagggg ccgagtaat ccgccagtt ggggcacgga aaacaaaag
 7441 ggaagctac taagatttt ctggcggggg ttatcattg cgttaactgca gggaccact
 7501 cccgggttga gggggctgga tctccaggct gcggattaag cccctccgt cggcgttaat
 7561 ttcaaactgc gcgacttcc taccctgct tcgccaaggc aggggccggg accctattcc

7621 aagagtagt aactagcagg actctagcct tccgcaattc attgagcgc tttacggaag
 7681 taacgtcggg tactgtctct ggccgcaagg gtgggaggag tacgcattg gcgtaagggt
 7741 gggcgtagag ccttcccgcc attggcggcg gatagggcgt ttacgcgacg gcctgacgta
 7801 gcggaagacg ccttagtggg gggggaagggt ctgaaaaagc ggcggcagcg gctctagcgg
 5 7861 cagtagcagc agcgcgggt cccgtgcgga ggtgctctc gcagagttgt ttctccagca
 7921 gcggcagttc tactacagc gccaggacga gtccggttcg tgttcgctcg cggagatctc
 7981 tctcatctcg ctggctcg ggaaatcggg ctgaagcgc tgagtcccg atggaggtaa
 8041 cgggtttgaa atcaatgagt tattgaaaag ggcatggcga gcccgttggc gcctcagtg
 8101 aagtcggcca gccgcctccg tgggagagag gcaggaaatc ggaccaatc agtagcagtg
 10 8161 gggcttaagg tttatgaacg ggttctttag cggaggcctg agcgtacaaa cagcttccc
 8221 accctcagcc tcccggcgcc atttccctc actgggggtg ggggatgggg agcttccaca
 8281 tggcggacgc tgccccgtg ggtgaaagt ggggcgcgga ggcgggactt cttatccct
 8341 ttctaaagca cgtgcttcg ggggccacgg cgtctctcg gggatctagc ttgtggaagg
 8401 ctactcgaat tggtgacc aagftaaaca atttaaaggc aatgctacca aataactaatt
 15 8461 gagtgtatgt aaacttctga cccactggga atgtgatgaa agaaataaaa gctgaaatga
 8521 atcattctct ctactattat tctgatattt cacattctta aaataaagtg gtgacctaa
 8581 ctgacctaa acaggaatt ttactagga ttaatgtca ggaattgtga aaaagtgagt
 8641 ttaatgtat ttggctaagg tgtatgtaa ctccgactt caactgata gggttcctc
 8701 agctagagac gacctcgggt acccagcttt tgtcccttt agtgagggtt aattgcgcgc
 20 8761 ttggcgtaat catggtcata gctgttctc gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca
 8821 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa
 8881 ctcacattaa ttgcgttcg ctactgcc gcttccagt cgggaaacct gtcgtgccag
 8941 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctctcc
 9001 gcttctcgc tactgactc gctgcgctc gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct
 25 9061 cactcaaagg cggtaatac gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg
 9121 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttctt ggcgttttc
 9181 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgc gctcaagtca gaggtggcga
 9241 aaccgcagac gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctc
 9301 cctgttccga cctgccctc taccggatac ctgtccgct ttctccctc gggaagcgtg
 30 9361 gcgcttctc atagctcag ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag
 9421 ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgcttacc cggtaactat
 9481 cgtcttgagt ccaaccggg aagacagcgc ttatgccac tggcagcagc cactggtaac
 9541 aggattagca gagcaggta ttagggcgt gctacagagt tctgaagtg gtggcctaac
 9601 tacggctaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc tctgaagcc agttacctc
 35 9661 ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctgtag cgggtgttt
 9721 ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tctttgatc
 9781 tttctacgg ggtctgacgc ttagtggaaac gaaaactcac gttaaaggat ttgtctatg
 9841 agattatcaa aaagatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaatac
 9901 atctaaagta tatatagta aacttggct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca
 40 9961 cctatctcag cgatctgtct atttcttca tccatagttg cctgactccc cgtcgttag
 10021 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac
 10081 ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc
 10141 agaagtggc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgtg ccgggaagct
 10201 agagtaagta gttcggcagt taatagttg cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc
 45 10261 gtgggtcacc gctcgtctt ttgtatggct tcaatcagct ccggttcca acgatcaagg
 10321 cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctcttcgg tctccgatc
 10381 gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgta tcaatcaggt ttatggcagc actgcataat
 10441 tcttactg tcatgccac cgtaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag

10501 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat
 10561 aataccgcgc cacatagcag aacttataaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg
 10621 cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca
 10681 cccaactgat cttcagcadc tttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga
 5 10741 aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc
 10801 ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata
 10861 tttgaatgta ttagaaaaa taaacaata ggggttcgc gcacattcc ccgaaaagtg
 10921 ccacctgacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggtgt tacgcgcagc
 10981 gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt ccctcctt
 10 11041 ctgccacgt tcgccgctt tcccctgcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc
 11101 cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt
 11161 agtgggcat cgccctgata gacggtttt cgcccttga cgttgagtc cagttctt
 11221 aatagtggac tctgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggc ctattcttt
 11281 gattataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gattaacaa
 15 11341 aaattaacg cgaatttaa caaaatatta acgcttaca ttccattcg ccattcaggc
 11401 tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctctc gctattacgc cagctggcga
 11461 aaggggatg tgctg

(57) Формула изобретения

- 20 1. Универсальный интеграционный вектор pVEAL, служащий для создания
 плазмидной генетической конструкции pVEAL-15742, имеющий нуклеотидную
 последовательность SEQ ID No. 1 и содержащий в соответствии с физической и
 генетической картой, представленной на Фиг. 1, следующие элементы:
- участок начала репликации *ori* (8616-9204);
 - 25 - последовательности IR/DR (L/R), являющиеся частью системы на основе транспозазы
 SB100 (139-403, 7832-8127);
 - последовательности UCSOE, предотвращающие хромосомное «замалчивание»
 рекомбинантной экспрессионной кассеты (416 - 1549, 6272-7820);
 - CMV Enhancer (2108-2487), CMV промотор (2488-2699) - сильный наиболее часто
 30 используемый промотор в генно-терапевтических конструкциях;
 - Chimeric intron (2860-2992), увеличивающий эффективность CMV промотора;
 - лидерный пептид V19, обеспечивающий экспорт белка из клетки (3114-3164);
 - место для встройки переменных фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела,
 соединенных пептидным линкером, по сайтам гидролиза AfeI (3157), BamHI (3339);
 - 35 - константную цепь антитела человека IgG1 (CH1-CH2-CH3) (3348-4031) с мутациями
 M252Y, S254T, T256E, E333A, N433K/N434F, которые увеличивают период полураспада
 антитела за счет взаимодействия с неонатальными рецепторами;
 - участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (4046-4620);
 - последовательность Bleo, кодирующую фактор устойчивости к антибиотику
 40 блеомицину (4625-4995);
 - последовательность SV40 poly(A) signal, необходимую для стабилизации мРНК-
 транскриптов (5042-5163);
 - SV40 промотор (5921-6262), обеспечивающий автономную репликацию в клетках
 млекопитающих, комбинация с CMV промотором существенно увеличивает выход
 45 белка;
 - ген устойчивости к антибиотику ампициллин AmpR и бактериальный промотор
 гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку
 плазмиды в *E.coli* (9375-10235).

2. Плазмидная генетическая конструкция pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию целевого белка scFv-Fc антитела ADI 15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих, имеющая нуклеотидную последовательность SEQ ID No. 2 и содержащая в соответствии с физической и генетической картой, представленной на

5 Фиг. 2, следующие элементы:

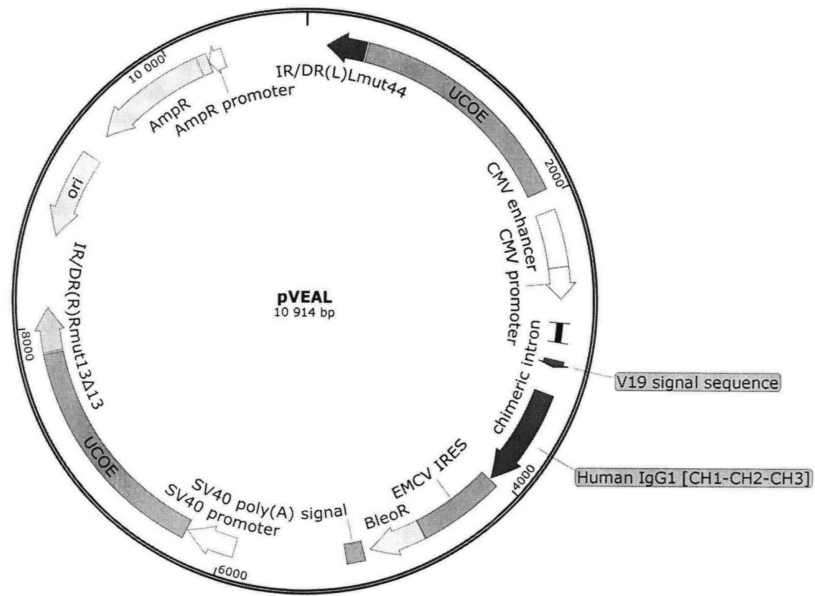
- участок начала репликации *ori* (8616-9204);
- последовательности IR/DR (L/R), являющиеся частью системы на основе транспозазы SB100 (139-403, 8393-8688);
- последовательности UCOE, предотвращающие хромосомное «замалчивание»
- 10 рекомбинантной экспрессионной кассеты (416 - 1549, 6833-8381);
- CMV Enhancer (2108-2487), CMV промотор (2488-2699) - сильный наиболее часто используемый промотор в генно-терапевтических конструкциях;
- Chimeric intron (2860-2992), увеличивающий эффективность CMV промотора;
- лидерный пептид V19, обеспечивающий экспорт белка из клетки (3114-3164);
- 15 - ADI-15742-VH, последовательность, кодирующая варибельный фрагмент тяжелой цепи антитела 15742 (3165-3533);
- ADI-15742-VK, последовательность, кодирующая варибельный фрагмент легкой цепи антитела 15742 (3579-3903);
- константную цепь антитела человека IgG1 (CH1-CH2-CH3) (3909-4592) с мутациями
- 20 M252Y, S254T, T256E, E333A, H433K/N434F, которые увеличивают период полураспада антитела за счет взаимодействия с неонатальными рецепторами;
- участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (4607-5181);
- последовательность Vleo, кодирующую фактор устойчивости к антибиотику блеомицину (5186-5556);
- 25 - последовательность SV40 poly(A) signal, необходимую для стабилизации мРНК-транскриптов (5603-5724);
- SV40 промотор (6482-6823), обеспечивающий автономную репликацию в клетках млекопитающих, комбинация с CMV промотором существенно увеличивает выход белка;
- 30 - ген устойчивости к антибиотику ампициллин AmpR и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину, позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в E.coli (9936-10796).

35

40

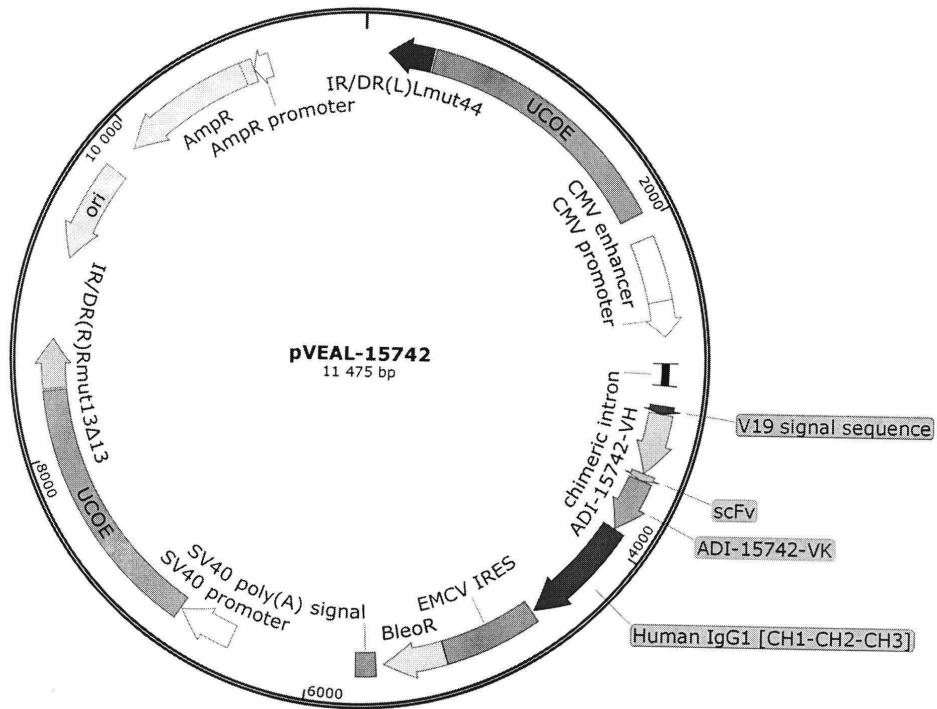
45

1

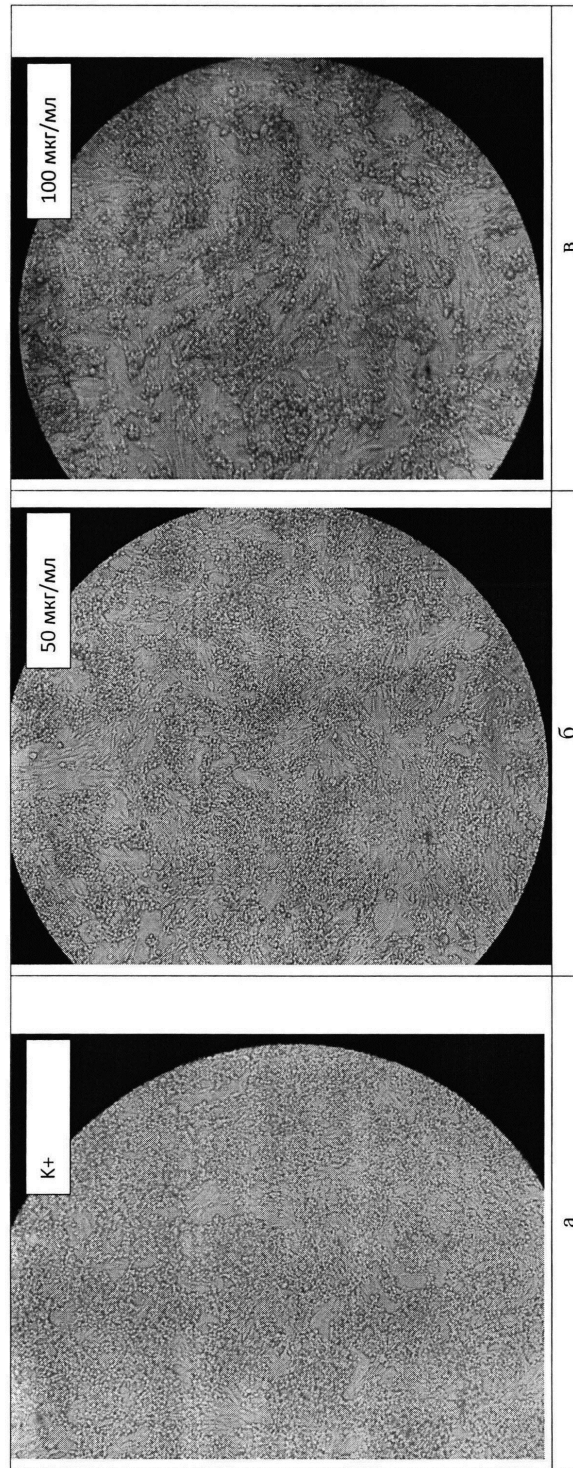


Фиг.1

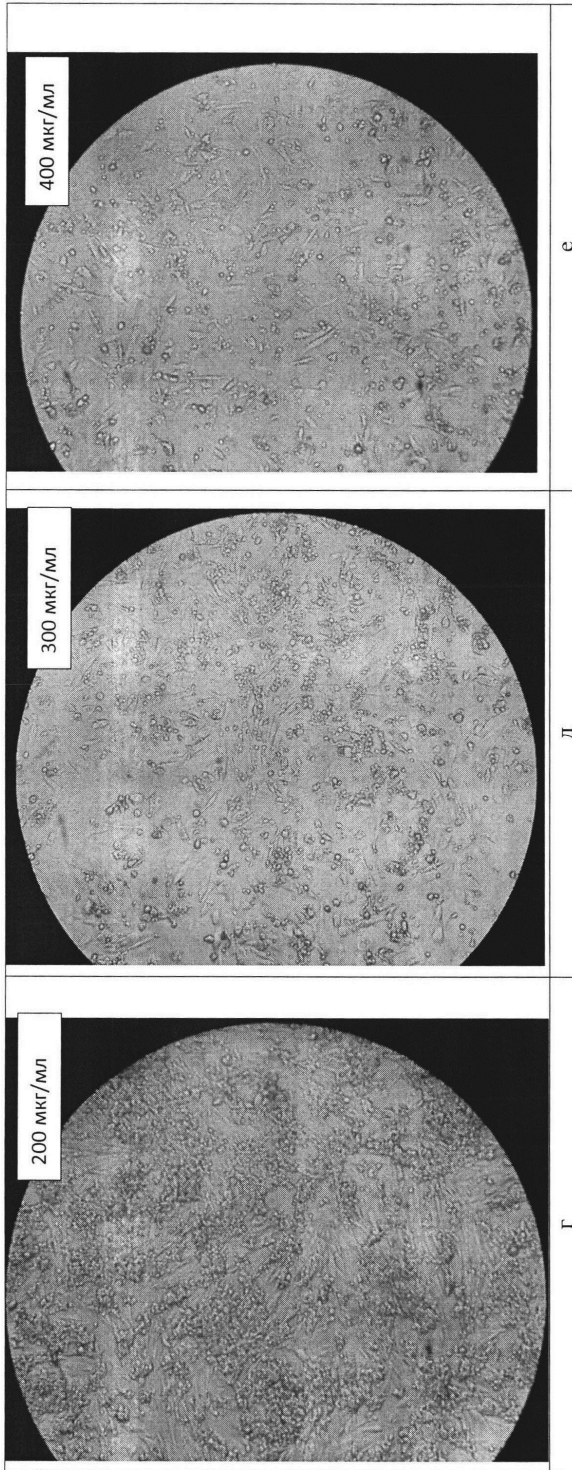
2



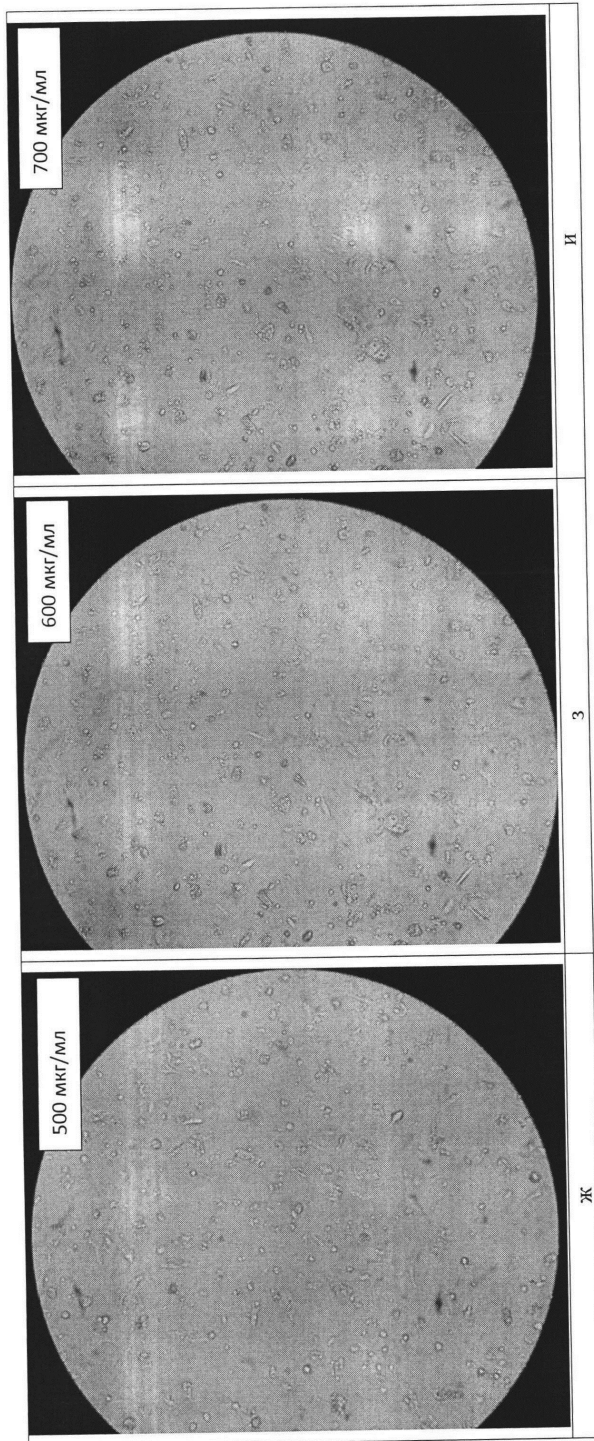
Фиг. 2



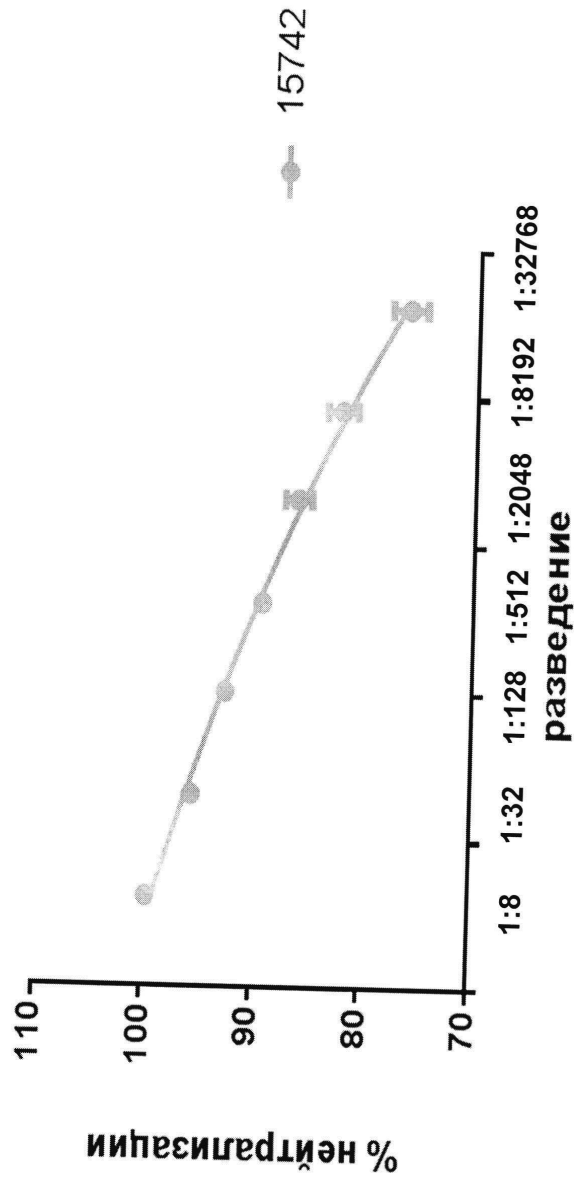
Фиг. 3



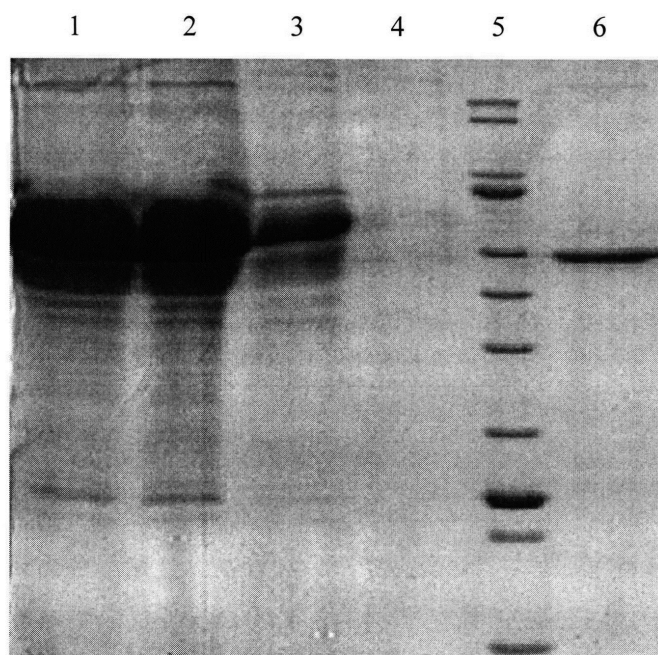
Фиг. 3 (продолжение)



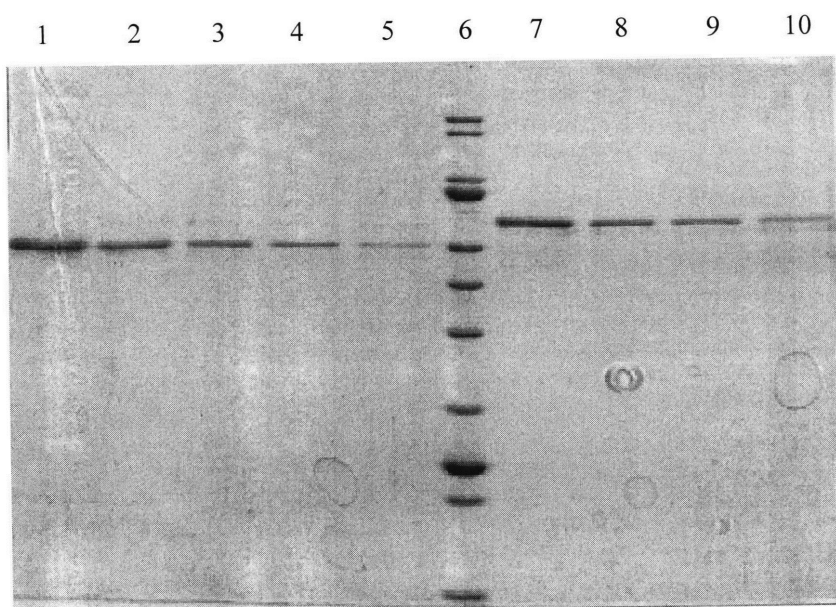
Фиг. 3 (продолжение)



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6