

Настоящее изобретение относится к новому тромболитическому средству, способам его выделения и фармацевтического применения.

Тромбозы обусловлены образованием сгустка крови в кровеносных сосудах. Различают венозные тромбозы, включая эмболию легочной артерии, и артериальные тромбозы, включая острый инфаркт миокарда.

Эмболия легких и сердечный инфаркт являются опасными для жизни заболеваниями, требующими неотложного медицинского вмешательства.

Кроме различных инвазивных способов, в последние годы развивается популярная форма терапии артериальных и венозных тромбозов, а именно ферментный тромболиз с плазминогенными активаторами. Эти вещества (названные тромболитиками) превращают плазминоген, неактивный профермент системы фибринолиза в крови, в активный протеолитический фермент, плазмин. Плазмин, в свою очередь, растворяет волокнистое вещество, фибрин, которое является основным компонентом кровяного сгустка; это приводит к открытию заблокированных сосудов и восстановлению кровяного потока. Однако плазмин является относительно неспецифической протеазой, т.е. однажды образовавшись в крови, она разрушает путем протеолиза компоненты крови, необходимые для интактного гемостаза (например, фибриноген) и в связи с этим при определенных обстоятельствах вызывает риск появления токсина, вызывающего кровоточивость тканей.

Тромболитики первого поколения, стрептокиназа и урокиназа, являются соединениями, которые, будучи однажды введенными в систему кровообращения, систематически превращают плазминоген в плазмин и вызывают общий протеолиз. Поэтому терапевтическое лечение тромболиза с помощью этих веществ часто сопровождается осложнениями, обусловленными кровотечением. Для решения этой дилеммы был предложен фибрин-специфичный тромболиз, в котором применяются рекомбинантные плазминогенные активаторы тканевого типа, названные в целях краткости t-PA. В кровообращении t-PA имеет только низкое сходство с плазминогеном. Однако в присутствии волокнистого вещества, фибрина, с которым t-PA взаимодействует специфичными местами связывания, это сходство возрастает за счет многочисленного, результирующего в плазмине образования на поверхности тромба. Эта концепция может быть проверена *in vitro* и в экспериментах с животными. Клинические исследования тем не менее показывают, что для достижения быстрого растворения коронарного тромбоза требуются большие количества t-PA.

Однако, если введены дозы t-PA такой величины, то это приведет к общему протеолизу, сопровождаемому относительным риском кровотечения, подобно тому, как это происходит в случае со стрептокиназой и урокиназой. Следовательно, сегодня речь идет об относительной фибриновой специфичности t-PA. Причина этого заключается в основной характеристике t-PA: эта молекула является активной протеазой, которая при благоприятных условиях (высокая ферментная концентрация, длительная выдержка по времени, высокая концентрация субстрата, оптимальное значение pH и ионного окружения) будет превращать плазминоген в плазмин даже в отсутствие фибрина. Все эти условия имеются при проведении клинической стандартной терапии с t-PA.

Во время исследований, для более специфичных плазминогенных активаторов, удовлетворяющих критерию специфичности фибрина, было найдено новое природное соединение, проявляющее фибринолитическую активность, называемое V-PA.

Изобретение касается тромболитически активного вещества V-PA, полученного из слюны летучих мышей рода *Desmodus* sp., отличающегося следующими характерными свойствами:

были открыты четыре различных кДНК из банка кДНК, полученных из слюнных желез, которые кодируют четыре различных V-PA белка:

(1) V-PA α_1 : высокомолекулярная форма, состоящая из пальцевой области, области эпидермального фактора роста (EGF), области Крингеля и области протеазы (пример 18).

(2) V-PA α_2 : высокомолекулярная форма с теми же областями, что и V-PA α_1 , но отличная от V-PA α_1 в нуклеотидной, также как и в аминокислотной последовательности.

(3) V-PA β : молекулярная форма, состоящая из области EGF, области Крингеля и области протеазы (пример 18).

(4) V-PA γ : низкомолекулярная форма, состоящая из области Крингеля и области протеазы.

Основная белковая полоска активного вещества V-PA α_1 демонстрирует молекулярный вес порядка 43000 ± 2000 (пример 2) при электрофорезе в геле додецилсульфат натрия при невозстановительных условиях.

Основная белковая полоска активного вещества V-PA β демонстрирует молекулярный вес порядка 39000 ± 3000 при электрофорезе на геле додецилсульфатнатрия при невозстановительных условиях и молекулярный вес порядка 43000 ± 2000 — при восстановительных условиях (пример 1).

— Активность активного вещества V-PA β элюирована из гелевой фильтрационной колонны ("Супероза" 12) с молекулярным весом порядка 40000 ± 3000 (пример 1).

— Изоэлектрические точки (pI) активного вещества V-PA β находятся между 6,8 и 8,5.

— Активное вещество взаимодействует с ^3H -диизопропил-фторфосфатом и таким образом является протеазой серина (пример 9).

— Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β гидролизуют хромогенные пептиды: S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA) и S-2444 (<Glu-Gly-Arg-pNA), но не хромогенный пептид S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) (пример 16).

— Активное вещество не связывает лизин "Сефароза" (пример 14) в пределах pH от 4 до 10,5.

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β вызывают ореолы лизиса на фибрин-планшетах, но не казеин-планшетах (пример 15).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β связываются с Zn^{++} хелатом "Сефароза" при pH 7,5 (примеры 1 и 2).

– Активное вещество V-PA β активирует плазминоген только в присутствии стимуляторов, таких как фибрин, но не в присутствии фибриногена (пример 7).

– Активное вещество V-PA β не следует классической кинетике Михаэлиса-Ментена в превращении плазминогена в плазмин в присутствии мономеров фибрина; V-PA β является ферментом, обладающим аллостерическими свойствами (пример 12).

– Активное вещество лизирует в зависимости от концентрации, тромбин крови человека *in vitro* (пример 8).

В восстановленной, свертываемой *in vitro*, системе активное вещество V-PA β не приводит к значительному распаду фибриногена (пример 10), в отличие от t-PA.

– В тесте на фибринолиз *in vitro* (International Clot-Lysis Assay) активное вещество вызывает фибринолиз в зависимости от концентрации (пример 13).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β связываются с гепарин-"Сефарозой" и могут быть вновь элюированы из нее с помощью подходящих растворов (пример 4).

Активное вещество связывается с иммобилизованным ингибитором, который выделяют из семян различных видов *Erythrina*, и может быть отделено от них с помощью подходящих растворов (пример 3).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β связываются с фибрином - "Целитом" и могут быть элюированы снова подходящими способами (пример 5).

– Активное вещество связывается с гидроокисью апатита при определенных условиях и может быть элюировано снова фосфатосодержащим буфером (пример 2).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β могут быть отделены один от другого и выделены соответствующими способами (примеры 2, 4 и 5).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β отличаются один от другого по отношению к их концевой аминокислотной последовательности (пример 6).

– Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β отличаются своими аминокислотной и нуклеотидной последовательностью (пример 18).

– Кодированная последовательность активных веществ может быть встроена в корреспондирующий вектор "септан". Они экспрессируют активное вещество в подходящих системах эукариотических клеток (пример 19).

Тромболитическое активное вещество V-PA представляет собой новый, природно встречающийся плазминогенный активатор, который растворяет сгустки крови в теле человека и таким образом является подходящим для лечения, например, сердечных инфарктов.

Это вещество обнаружено в слюне всех видов летучих мышей рода *Desmodus* спес. в малых концентрациях и, возможно, экспрессировано клетками слюнных желез животных этого типа. К летучим мышам рода *Desmodus* спес. относятся всякого рода летучие мыши Американского континента. Род *Desmodus* Центральной Америки и Мексики был подвергнут тщательному исследованию.

Изобретение относится также к некоторым способам выделения тромболитического V-PA из слюны *Desmodus* спес. согласно п.9 формулы изобретения, отличающегося тем, что центрифугированную слюну помещают в буфер, хроматографируют на Zn^{++} хелате "Сефароза" колонне, активное вещество V-PA после промывания количественно элюируют из колонны, собранные фракции фильтруют в отсутствие солей на "Суперозе" 12 и окончательно вновь подвергают фильтрации на геле в присутствии физиологического солевого раствора. Точные параметры процесса приведены далее в примере 1.

Изобретение дополнительно касается медицинских препаратов, содержащих соединения V-PA, а также соответствующие вспомогательные вещества и наполнители.

Преимущество нового тромболитика V-PA по сравнению с t-PA видно из примеров 7, 8, 10 и 15, приведенных ниже.

Под в основном чистым белком подразумевают, что белок очищен до такой степени, например, что его активность по сравнению с природным белком значительно усилена. Предпочтительно, белок будет очищен до гомогенности, а предпочтительнее, будет чистым по крайней мере на 90%, в частности более, чем на 95% и выше.

Последовательности ДНК, согласно настоящему изобретению, могут быть установленным образом встроены в общие, например, коммерчески доступные, векторы, такие как плазмиды, фаги и т.д., используемые для экспрессии в, например, общих, коммерчески доступных линиях клеток.

Олигонуклеотидные пробы, специфичные для V-PA последовательностей, могут быть сконструированы установленным образом путем отбора последовательностей в ведущем регионе или в полной последовательности, которые отличаются от t-PA (см. сравнение на фиг.27).

V-PA- β 141	CTGTTGTGTGTA	CTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCAGGCA	
190			
t-PA 98	CTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTTCCCCAGCCA		
147			
V-PA β 191	GGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGG	216	
t-PA 148	GGAAATCCATGCCCCGATTCAGAAGAG	173	

Показанные выше последовательности являются последовательностями ДНК пробы, используемой для техники поиска мутантных организмов на селективных средах в библиотеке фрагментов кДНК, выделенной из клона VPA β путем ферментного разложения с рестрикцией эндонуклеаз BamHI и AluI (VPA β) и корреспондирующей последовательности из t-PA клона кДНК (t-PA).

Антитела могут быть также получены установленным образом известными способами, например, путем выращивания их на животных, таких как козы.

V-PA согласно настоящему изобретению может быть введено млекопитающим, включая людей, аналогично использованию t-PA, но с лихорадочным побочным эффектом, обусловленным селективностью V-PA, как упоминалось выше. В общем могут быть использованы более низкие дозы, чем требовались для t-PA. Необходимые активности могут быть определены установленным образом путем использования соответствующих методик. Типичные указания включают такие, для которых используются тромболитики, например, сердечный инфаркт, удар (приступ), артериальный тромбоз и т.п. Обычные галеновые добавки могут быть использованы для получения фармацевтических соединений.

Пример 1

Обработка 60-мл пробы слюны, полученной от летучей мыши-вампира *Desmodus rotundus*, содержащей первоначально молекулярную форму V-PA β

(а) Хроматография на Zn^{++} хелате "Сефароза"

60 мл слюны центрифугируют при 4°C и 6000 г. Этот супернатант помещают к 20 ммоль Трис pH 7,5/100 mM NaCl/0,01% Плулоника F 68 и вводят в хроматографическую колонну, наполненную 200 мл хелата "Сефароза" быстрым потоком, и уравнивают 10 mM Трис pH 7,5/100 mM NaCl/1 mM имидазола/0,01% Плулоника F 68. Колонну промывают этим буфером до тех пор, пока оптическая плотность, замеренная при 280 нм, достигнет основной линии (около 600 мл). После этого V-PA элюируют градиентом 1-50 mM имидазола (1000 мл) в 10 mM Трис pH 7,5/100 mM NaCl/0,01% Плулоника F 68 (фиг.1). Этот этап очистки проводят при 4°C. AF=Полная шкала единиц абсорбции. График см. в приложении.

(b) Гель-фильтрация без NaCl

5 мл PA-содержащей фракции из хроматографии на Zn^{++} хелате "Сефароза" хроматографируют на "Суперозе" 12 HR 16/50 хроматографирующей колонне (Pharmacia) в 20 mM Трис pH 8,0/0,01% Плулоника F 68 с помощью системы быстрой хроматографии белков высокого разрешения (FPLC) (Pharmacia) (фиг. 2 в приложении).

На этом этапе очистки отделяют протеазу, не имеющую вообще фибринолитической активности. Фракции с V-PA активностью собирают.

(с) Гель фильтрация с NaCl

2 мл описанного выше V-PA пула концентрируют лиофилизацией до 0,2 мл, и хроматографируют в 50 mM Трис pH 8,0 (160 mM NaCl) 0,01% Плулоника F 68 на хроматографирующей колонне "Супероза" 12 HR 10/30 (Pharmacia) с помощью системы быстрой хроматографии белков высокого разрешения (Pharmacia) (фиг. 3 в приложении).

V-PA элюируют как гомогенный острый пик с молекулярным весом около 40000.

Результат процесса очистки сведен на фиг.4 (см. приложение).

На фиг.4а показан образец из каждой очищающей стадии в невосстановительном электрофорезе на геле додецилсульфатнатрия с методом чувствительного контрастирования серебра. На фиг. 4В показано, что V-PA β состоит из белковой цепочки, потому что во время расщепления дитиотрептолом дисульфидных мостиков молекула не расщепляется на две белковые полоски. Происходит только видимый рост молекулярного веса, что может быть объяснено переводом белковой цепочки в линейную форму с помощью дитиотрептола.

Концентраты с обогащенной активностью подвергают электрофорезу на геле додецилсульфатнатрия при невосстановительных условиях в геле 8-25% градиента силы.

Некоторые из гелей окрашиваются в серебро, делая видимыми свои белки; другие промывают в Трилоне X-100 (1%) для удаления додецилсульфатнатрия и помещают на фибринокасающий гель, содержащий плазминоген (Fibrin-Zymographie; Gra-nelli-Aiperno A. and Reich E., J.Exp.Med. 148:223-234, 1978).

Активность активного вещества V-PA β , выявляемого за счет ореола лизиса на геле-индикаторе, соответствует белковой полоске с истинным молекулярным весом, равным 39000 \pm 3000. Ореол лизиса может быть обнаружен исключительно на плазминогенсодержащих гелях индикатора фибрина, но не на гелях-индикаторах фибрина, не содержащих плазминогена или плазминогенсодержащих гелях-индикаторах казеина. t-PA, подвергнутое идентичному процессу, вызывает ореол лизиса также на плазминогенсодержащих гелях-индикаторах казеина.

Активность очищенного активного вещества V-PA β таким образом идентична белку с истинным молекулярным весом, равным 43000 \pm 2000 (при восстановительных условиях при электрофорезе на полиакриламиде додецилсульфатнатрия, фиг.4В), превращающего плазминоген в плазмин в присутствии фибрина, приводящего к растворению волокнистого вещества фибрина. В отличие от t-PA, который может активировать плазминоген также в присутствии казеина, V-PA β не способен превращать плазминоген в плазмин в присутствии казеина.

Настоящее изобретение может быть дополнительно охарактеризовано на основании примеров, приведенных ниже.

Пример 2

Очистка и отделение V-PA α_1 и V-PA β из слюны летучей мыши-вампира *Desmodus rotundus*

(а) Хроматография на Zn^{++} хелате "Сефароза"

20 мл слюны центрифугируют при 4°C и 6000 г. Супернатант разбавляют до 20 мМ Трис pH 7,5/100 мМ NaCl и 0,05% Плуроник F 68. Хроматографическую трубку наполняют 8 мл Zn^{++} Хелата "Сефароза", уравновешенного 10 мМ Трис pH 7,5/100 мМ NaCl/1 мМ имидазола/0,05% Плуроник F 68, и затем хроматографируют супернатант слюны. Колонну промывают уравновешивающим буфером. После этого 10 мМ Трис pH 7,5/1 мМ NaCl/1 мМ имидазола/0,05% Плуроник F 68 первоначально элюируют V-PA α_1 , который еще содержит малую пропорцию V-PA (фиг.5). Затем V-PA β , содержащий маленькую пропорцию V-PA α_1 , элюируют градиентом 1-50 мМ имидазола в 10 мМ Трис pH 7,5/100 мМ NaCl/0,05% Плуроник F 68.

Фиг.5 см. в приложении.

Активные вещества V-PA α_1 и V-PA β связываются при низких концентрациях NaCl с фибрином "Целит" и могут быть элюированы путем повышения концентрации NaCl в буфере. Во время этой операции можно наблюдать, что V-PA β ясно демонстрирует слабое связывание с фибрином "Целит" по сравнению с V-PA α_1 , тогда как в противоположность V-PA β форма V-PA α_1 элюирует только при более высокой концентрации NaCl. Таким образом, данный способ очистки может быть использован для отделения V-PA β и V-PA α_1 .

(b) Хроматография гидроокиси апатита

Хроматографическую колонну загружают 8 мл гидроокиси апатита и уравновешивают 50 мМ Трис pH 8,0/500 мМ NaCl/0,01% Плуроника F 68. Пул из Zn^{++} хелатной хроматографии (фиг.5) пропускают через колонну с гидроокисью апатита и промывают уравновешивающим буфером, а затем V-PA элюируют градиентом 0,5-100 мМ фосфата Na pH 7,5 в 500 мМ NaCl/0,01% Плуроник F 68 (фиг.6). Активные фракции собирают.

Фиг. 6 см. в приложении.

(c) Гель-фильтрация

Пул, полученный при хроматографии гидроокиси апатита (фиг. 6), диализуют 20 мМ Трис pH 8,0/160 мМ NaCl и концентрируют до 0,6 мл лиофилизацией. Этот концентрат фильтруют с помощью системы быстрой хроматографии белков высокого разрешения (Pharmacia) на колонне "Супероза" 12 HR 16/50 (фиг.7).

Фиг.7 см. в приложении.

Если проанализировать концентрат активных фракций гель-фильтрации с помощью электрофореза на геле полиакриламида додецилсульфатнатрия при невосстановительных условиях и после этого окрасить гель кумасси голубым, то становится видимой белковая полоска с молекулярным весом 43000 (фиг.8 см. в приложении).

Как видно из фиг.8, V-PA α_1 не содержит других белков. Также очищенные биомассы V-PA α_1 , как описано в примере 1с, имеют ореол лизиса с идентичным молекулярным весом, равным 43000, на индикаторном геле (фибриновая зимография). Такой ореол лизиса может быть обнаружен исключительно на плазминогенсодержащем фибринном индикаторном геле, а не на плазминогенсодержащем казеино-индикаторном геле.

Пример 3

Связывание и элюция V-PA α_1 и V-PA β с ингибитором трипсина E-3, полученного из семян *Erythrina latissima*/ETI

50 мг ETI (Erytech Services LTD, Arcadia, Южная Африка) соединяют в ковалентном виде с 6,6 г активированного СН "Сефароза" 4В (Pharmacia) в соответствии с рекомендациями изготовителя. 16 мл слюны разбавляют до pH 7,5 1 М Трис pH 6,8 и центрифугируют в течение 10 минут при 4°C и 6000 г.

Хроматографическую трубку HR 10/2 (Pharmacia) наполняют 2 мл ETI-СН "Сефароза" 4В (см.выше). С помощью системы быстрой хроматографии белков высокого разрешения (Pharmacia) проводят аффинную хроматографию. Для этой цели супернатант слюны пропускают через ETI-СН "Сефарозу" 4В и тщательно промывают 20 мМ Трис pH 7,5 (400 мМ NaCl) 0,01% Плуроника. Элюцию осуществляют раствором 20 мМ Трис pH 7,5 (400 мМ NaCl) 1,6 М KSCN/0,01% Плуроника F 68. Во время этой операции фибринолитическая активность так же, как амидолитическая активность, проявляется вместе на одном белковом пике.

Фиг.9 см. в приложении.

При анализе этой хроматографии с помощью электрофореза на геле полиакриламида додецилсульфатнатрия при невосстановительных условиях может быть подтверждено сильное обогащение обеих форм V-PA, V-PA α_1 и V-PA β .

Обе молекулярные формы V-PA, встречающиеся в данной дозе слюны, связываются при указанных выше условиях с ETI-СН "Сефарозой" 4В и могут быть элюированы в присутствии 1,6 М KSCN или других хаотропических соединений. Это справедливо для всех видов активного вещества.

Фиг.10 см. в приложении.

Пример 4

Связывание и элюция активных веществ V-PA α_1 и V-PA β с гепарином "Сефароза"

Незаполненную колонку быстрой хроматографии белков высокого разрешения (HR 5/5) наполняют 1 мл гепарина "Сефарозы" (Pharmacia). Фракцию 18 из ETI-СН "Сефароза" 4В хроматографии (пример 3, фиг.9 и 10) диализуют на 20 мМ Трис pH 7,5/50 мМ NaCl/0,01% Плуроник F 68 и хроматографируют на гепарине "Сефароза" с помощью системы быстрой хроматографии белков высокого разрешения (Pharmacia). После применения диализата колонку промывают 20 мМ Трис pH 7,2/50 мМ NaCl/0,01% Плуроник F 68 и затем элюируют градиентом 50-1000 мМ NaCl в 20 мМ Трис pH 7,2/0,01% Плуроник F 68 (фиг.11 и 12 см. в приложении).

Таким образом, с помощью хроматографических методов, описанных в этом примере, возможно отделить одну от другой две формы V-PA.

Связывание и элюция активных веществ V-PA α_1 и V-PA β с фибрином "Целит"

Пример 6

V-PA α_1
1
5
Ala Tur Glu Val Ala X Lys X Glu Ile Thr Gln Met
15
Thr Tyr Arg

V-PA β
1
5
Ala Tyr Glu Glu X Ser Glu Len Arg Gys Phe Asu Gly Gly
15
Thr X Gln Ala
Ala
(X - точно не определено).

Объем каждого отверстия составляет 220 мл. Концентрация плазминогена составляет 0,5 mM; 0,68 mM; t-PA 0,05 Иед; использованная активность t-PA, определена в соответствии с International Clot-Lysis Assay (Gattney, P.I., Curtis, A.D. Thrombos, Haemostas, 53: 134-136, 1985) в десять раз выше, т.е. составляет около 0.5 ед. Концентрация количеств стимуляторов составляет около 20 г/отв.

Пример 8

Тромболитическую активность нового активного вещества исследуют в сравнении с t-PA в новом, разработанном "Анализе лизиса микросгустка" Micro-Clot Lysis Assay (MCLA). В отверстия микротитровочных пластин вносят пипеткой соответственно 10 мл свежей крови человека, соединенной соответственно с 10 мл свертывающего вещества ("Thromborel", Behring-Werke) и инкубируют при 37°C в течение 1 часа. Результирующие сгустки крови дважды промывают фосфат-забуференным раствором хлорида натрия (PBS) перед тем, как они соединяются с 100 мл аутологичной плазмы, предварительно полученной центрифугированием. Плазму последовательно соединяют с t-PA и, соответственно, с V-PA в концентрациях от 1,56 до 12,5 Ед/мл. Обработанные таким образом микротитровочные пластины сохраняют в течение 18 часов при 37°C во влажной камере. После прохождения инкубационного периода, пластины встряхивают на вибрационном столе (Red Rotor), и после этого образец плазмы извлекают из каждого отверстия, добавляя дважды дистиллированной водой в соотношении 1:6 (что приводит к разрушению красных

кровенных клеток, освобожденных путем лизиса), а затем освобожденный таким образом красный кровяной пигмент измеряют фотометрически при 492 нм на микротитровочном пластинчатом фотометре.

Результат теста виден из рисунков 16a и 16b. По сравнению со стандартным t-PA, равноэффективные концентрации нового активного вещества лизируют, как определено в международном анализе лизиса сгустка (International Clot-Lysis Assay), тромбин крови человека лучше, чем t-PA. Даже около 3 ед/мл нового активного вещества

V-PA β демонстрирует, в описанной модели теста, значительное тромболитическое действие, тогда как 3 ед. t-PA не проявляет результатов, отклоняющихся от контрольного.

В подобном опыте исследована временная зависимость тромболиза крови человека с помощью t-PA и V-PA.

Соответственно 6,25 и 12,5 ед. t-PA и t-PA инкубируют в описанной выше системе в течение 23 часов при 37°C. После 15 часов каждые 2 часа извлекают пробу и готовят ее, как описано, для фотометрического теста. Результат показан на фиг. 17a и 17b.

Начало тромболиза, определяемое как освобождение красных кровяных клеток из тромба, является заметно более быстрым при наличии активного вещества, чем при наличии t-PA. 6,25 единиц нового активного вещества вызывают усиленный тромболиз после 23 часов, как двойная активность t-PA (12,5 единиц).

Пример 9

Сериновые протеазы специфично взаимодействуют с "Активным титрирующим сайтом" диизопропил фторфосфата (DIFP)

Для этой цели активное вещество буферизуют до pH 8,0 и смешивают в отношении 1:20 с 3Н - DIFP в пропилен гликоли. Дозу инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. Аликват дозы отделяют на 12,5% додецилсульфатнатриевом геле при невосстановительных условиях. Затем гель инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре в "Amplify" (Amersham) и последовательно высушивают. Затем гель экспонируют в течение 4 дней и последовательно разворачивая рентгеновскую пленку. Сериновые протеазы, имеющие встроенный радиоактивно меченный DIFP, становятся видимыми на пленке, как зачерненные полосы (фиг. 18). Биомассы t-PA, например, представляют собой слегка зачерненную основную полосу с истинным молекулярным весом 68000 ± 5000 ; в противоположность этому новое активное вещество демонстрирует сильно зачерненную основную полосу с молекулярным весом 39000 ± 2000 (V-PA β) и зачерненную полосу с молекулярным весом 43000 ± 2000 (V-PA α_1).

Контрольный гель, полученный в идентичных электрофоретических условиях, промывают 1% Три-тором X-100 и последовательно помещают на фибрин- и плазминогенсодержащий индикаторный гель. Положение активностей электрофорезированного активного вещества совпадает с зачерненной полоской 3Н-DIFP меченой сериновой протеазой, представляющей активное начало вещества.

Пример 10

Фибриногенное разложение in vitro t-PA и V-PA β

При инкубировании t-PA в плазме человека при 37°C концентрация свертываемого фибриногена уменьшается в зависимости от времени. Это обусловлено относительной фибриновой специфичностью t-PA и является характерным свойством данного тромболитика. Раствор, приготовленный из 3 мг свертываемого фибриногена человека и соответственно 1 мл 50 мМ Трис pH 7, 4, 40 мМ NaCl, соединяют затем с 1 мМ плазминогена человека. Порцию аликвата дозы соединяют с 3,1, 6,25 и 12,5 единицами t-PA, и соответственно, с теми же активностями V-PA. Третья доза без плазминогенного активатора служит в качестве контрольной. Использовано соответственно 6 доз для группы обработки. Сразу после добавления плазминогенных активаторов из всех доз удаляют один аликват и определяют свертываемый фибриноген с использованием метода Клаусса (Clauss, V.A., Acta Haematol 17:237-246, 1957). Порцию аликвата затем анализируют путем электрофореза на геле. Дополнительные изъятия аликватов из доз, инкубированных при 37°C, производят через 2,4 и 6 часов.

Периоды свертывания согласно Клауссу приведены в секундах. Как ранее, так и после двух часов инкубации, ни одна из t-PA-содержащих доз не демонстрирует свертываемого фибриногена; периоды свертывания составляли >300 сек. В противоположность этому, признаки разложения фибриногена отсутствуют и в контрольных дозах и в дозах, соединенных с новым активным веществом. Этот опыт показывает значительно более высокую, если не абсолютную, фибриновую специфичность нового активного вещества V-PA β по сравнению с t-PA.

При анализе аликват, проведенном путем гель-электрофореза, можно утверждать, что фибриноген в дозах с активным веществом нельзя отличить от фибриногена в контрольных дозах даже после 6 часов инкубации, поскольку может быть обнаружен только расщепленный фибриноген в дозах с t-PA после периода, равного только 2 часам.

Пример 11

Связывание фибрина различных плазмино-генных активаторов и V-PA α_1 и V-PA β

В препаративной кювете инкубируют при 37°C в течение 10 минут 100 л не содержащего плазминогена фибриноген (2 мг/мл) в PBS/0,01% "Твин" 80, 10 мл соответствующих плазминогенных активаторов в различных концентрациях и 10 мл тромбина (0,3 ед). Затем образованный таким образом фибрин удаляют путем центрифугирования в течение 5 минут при 10000 г, а активность остаточного плазминогенного активатора определяют в супернатанте посредством метода чашечного (пластинчатого) тестирования фибрина и приводят в соответствие с исходным объемом.

Параллельно с этим, при тех же условиях, готовят растворы плазминогенных активаторов без фибрина (контрольный; нет связывания). Фиг.19. Связывание PA с не содержащим плазминоген фибрином.

V-PA α_1 демонстрирует похожее хорошее связывание фибрина как и t-PA (фиг.19). В противоположность этому, V-PA β проявляет существенно более слабое фибринное родство, чем V-PA α_1 . Это фибринное родство, проявляемое V-PA β , является, кроме того, сильно зависящим от концентрации NaCl (фиг. 19 см. в приложении).

Пример 12.

Сравнительные кинетики Glu-плазминогенной активации с помощью t-PA и V-PA β

(А) В сосуде инкубируют в 20 мМ Трис pH 7,4 и 170 мл 20 мМ Трис pH 7,4/0,01% Твин 80 при 37°C и помешивании 20 мл плазминогенного активатора, 10 мл мономера в фибрине (60 мг/мл) в 20 мМ Трис pH 7,4/600 мМ мочевины, 50 мл плазмин не содержащего плазминогена (возможные концентрации от 0 до 6 мМ в полной реакционной дозе).

(В) В дополнительных трубках при 37°C содержат соответственно 100 мл хромогенного, плазмин-специфичного субстрата S 2251 (3 мМ) в воде и 400 мл 20 мМ Трис pH 7,4/180 мМ NaCl.

В различные моменты времени отбирают 20 мл из (А) и переносят в трубку (В), инкубируют в течение следующего часа при 37°C и реакцию останавливают 300 мл 1М лимонной кислоты. Плазмин, образовавшийся в инкубационной дозе, расщепляет пептидную группу хромогенного субстрата S 2251 с высвобождением p-нитроанилина. Указанный p-нитроанилин измеряют фотометрически при 405 нм.

Аналогично описанной выше схеме получают градуировочную кривую с чистым плазмином, на основании которой можно непосредственно рассчитать концентрацию образованного плазмина.

На фиг.20 (V-PA β и фиг.21 (t-PA) - нанесены полученные данные. Для этой цели скорость образования плазмина нанесена напротив концентрации плазмина.

В случае с t-PA получена типичная кинетика Михаэлиса-Ментена. При перенесении указанных данных t-PA на график Лайнвэйвера-Барка (вставка на фиг. 21) получают прямую линию.

Совершенно отличная картина получается при нанесении на график данных V-PA β . Плазминогенный активатор V-PA β демонстрирует отличное кинетическое поведение от t-PA. Полученная кривая не следует кинетике Михаэлиса-Ментена, но демонстрирует типичное поведение аллостерического фермента; график Лайнвэйвера-Барка также дает типичную кривую для аллостерического фермента (фиг. 20).

Плазминогенный активатор V-PA β в отличие от t-PA является аллостерическим ферментом.

Пример 13

Действие V-PA β на восстановленную систему растворения сгустка (International Clot-Lysis Assay)

Очищенный фибриноген человека получен для свертывания с тромбином в присутствии постоянного количества плазминогена человека и различных концентраций плазминогенного активатора. В образованном таким образом сгустке плазминоген затем превращается в плазмин с помощью плазминогенных активаторов. Этот плазмин, в свою очередь, растворяет волокнистое вещество фибрин в сгустке. Замеряют время между добавлением тромбина и полным растворением сгустка и наносят двойным логарифмированием на концентрацию плазминогенного активатора. В соответствии с описанным выше правилом, 12,5-100 мл забуференного раствора очищенного активного вещества тестируют и сравнивают с 12,5-100 Ед. t-PA.

Результаты приведены на фиг. 22.

Новое активное вещество V-PA β , по сравнению с t-PA, дает параллельную кривую концентрация - эффект. 100 мл раствора очищенного активного вещества содержат, в соответствии с данными теста, около 40 единиц t-PA - сравнимой активности.

Более детальное описание теста:

Лиофилизированный контрольный тромбин (Behring, Марбург) растворяют в 1 мл дистиллированной воды. Это составляет 30 ед/мл активности. Плазминоген человека (Kabi, Мюнхен) растворяют в 2 мМ HCl+50% глицерина+5 г/л PEG 6000. Активность в результате составляет 10 Ед/мл. Фибриноген человека (Kabi, Мюнхен) доводят до концентрации 2 мг/мл свертываемого белка в фосфатном буфере, имеющем следующий состав: 1,605 г/л KH_2PO_4 ; 8,58 г/л Na_2HPO_4 x $\text{x} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 100 л/л Твин 80; 500 мг/л сывороточного альбумина человека. Стандартный t-PA разбавляют до активности 1000 Ед/мл.

20 мл плазминогена+100 мл тромбина вносят пипеткой в контрольную трубку и инкубируют при 37°C. 1 мл фибриногена и 12,5-100 мл плазминогенного активатора добавляют одновременно и включают секундомер. Через 2 минуты на сгусток помещают стеклянный шарик (диаметром 6 мм). Как только стеклянный шарик достигнет дна контрольной трубки, секундомер останавливают и записывают время.

Пример 14

Связывание V-PA β и t-PA с лизином "Сефароза" 4В

Плазминные активаторы доведены до соответствующих значений pH и обработаны при этих условиях лизином "Сефароза". Лизин "Сефароза" тщательно промывают, а активность определяют в комбинарованных супернатантах. Опыты по элюции с малыми количествами V-PA можно не проводить.

Пример 15

Казеинолизис V-PA β и t-PA

Активность плазминогенных активаторов может быть определена с помощью так называемого теста фибриновых пластинок (Astrup T and Mullertz in Arch Biochem.Biophys. 40:346-351, 1952). Плазминогенные активаторы инкубируют в предварительно пробитых отверстиях при 37°C. В случае присутствия плазминогена образованный таким путем плазмин будет лизировать фибрин, и образуется ореол лизиса, диаметр которого зависит от концентрации примененного плазминогенного активатора. Ожидается, что фибриноспецифичный плазминогенный активатор не будет взаимодействовать с другими белками, а только с фиб-

рином. Это может быть проверено описанными выше способами, заменяя фибрин казеином с плазминогеном (фиг. 24).

Как видно из фиг. 24, V-PA β , по сравнению с t-PA, не демонстрирует появление ореолов лизиса где-либо на плазминогенсодержащих казеиновых пластинках. Эти точки подтверждают абсолютную фибринную специфичность V-PA β .

Пример 16

Определение K_m значения различных амидолитических субстратов с плазминогенными активаторами t-PA, урокиназой и активных форм V-PA α_1 и V-PA β

В чашечке (пластинке) с 96 отверстиями инкубируют соответственно 90 мл 100 мМ Трис pH 8,0 (100 мл NaCl) 0,01% Твин 80 и 50 мл соответствующего хромогенного субстрата (все из Стокгольма, Швеция) с конечной концентрацией, равной 0,03/0,06/0,1/0,3/0,6 и 1 мМ с 10 л (3 единицы на отверстие) соответствующего плазминогенного активатора при 37°C, а высвобождаемый таким образом p-нитроанилин определяют фотометрически при 405 нм в различных точках в период времени от 1 до 7 часов. Результирующие данные были обработаны с помощью графика Лайнвэйвера-Барка, а значение K_m определено (Segel, I.M. Enzyme Kinetics, John Wiley and Sons, New York).

Были использованы следующие хромогенные субстраты:

H-D-Val-Leu-Lys-pNa (S-2251)
H-D-Ile-Pro-Arg-pNa (S-2288)
<Glu-Gly-Arg-pNa (S-2444)

Были определены следующие значения K_m (моль/л):

Плазминогенный

активатор

S-2288

S-2444

t-PA

0,7 (1,0)

2,0

урокиназа

0,1 (0,09)

0,4 (0,2)

V-PA α_1

1,0

2,0

V-PA β

2,0

2,0

Значения, указанные в скобках, взяты из литературы (Friedberger, P., in Scand. J Clin. Lab. Invest. 42 - Supplement 1.62., 1982).

Активные формы вещества V-PA α_1 и V-PA β демонстрируют похожие значения K_m , как и в случае t-PA. V-PA α_1 , V-PA β и t-PA не демонстрируют никакого превращения с хромогенным субстратом S-2251.

Пример 17

Выделение и идентификация клонов кДНК с сегментами для плазминогенных активаторов из слюнных желез летучей мыши-вампира *Desmodus rotundus*

1. Получение банка генов кДНК

Из слюнных желез *Desmodus rotundus* выделяют целую РНК согласно методу изотиоцианата гуанидина (Chirgwin, J.M.Przybyla, A.E., MacDonald, P.J., Rutter, W.J.Biochemistry 18: 5294-5299, 1979). Из 500 мг целой РНК, 25 мг поли А±РНК выделяют аффинной хроматографией олиго (dt) целлюлозы [Aviv, H., Leder, P., Proc.Natl.Acad.Sci. США 69: 1408-1412 (1972)].

Синтез кДНК проводят согласно методу Габлера и Хоффмана [Gubler, U., Hoffmann, B., Gene 25:263-268 (1983)] с использованием набора Syntex кДНК Pharmacia LKB Biotechnology AB. Индивидуальные шаги предпринимаются точно в соответствии с указаниями изготовителя. Двойная спираль кДНК, полученная с EcoRI адаптерами (микрограмм) связывается с EcoRI - разрывом, дефосфолированным фагом вектора лямбда gt 10 (4 мл) с использованием Т4-ДНК лигазы [Huynh, T.V., Joung, A., Da-vis, R.W. in Practical Approaches in Biochemistry, DNA Cloning, volume 1, ed. Glown, D.M.JRL Oxford, Washington DC, (1985)]. Дозу лигазы помещают в инфекционные фаги, используя упаковочные экстракты (Gigapack II Gold Packaging extracts of stratagene. La Jolla, USA) в соответствии с указаниями изготовителя. Полученный таким образом первичный банк генов кДНК содержит 1×10^6 рекомбинантных лямбда-фагов.

2. Скрининг банка генов кДНК с 32 P-меченой последовательностью гена кДНК для тканеспецифического плазминогенного активатора человека (t-PA) кДНК последовательность t-PA (Fisher, R., Waller, E.K., Grossi, G., Thompson, D., Tizard, R., and Schleuning, W.-D, J.Biol.Chem. 260: 11223-11230, 1985, меченую радиоактивно с помощью никтрансляции [Mani-atis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular Cloning, A.Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)] служит в качестве пробы для идентификации кДНК плазминогенного активатора слюны летучей мыши-вампира. ДНК, состоящую в общем из 50000 рекомбинантных лямбда-фагов, трансформируют на мембраны "Replika" Gene Screen Plus, товарный знак фирмы Du Pont de Nemours, NEN Research Products.

Обработка мембран и состав гибридизационных растворов соответствует данным, полученным производителем. Температура гибридизации и промывания составляет 42°C. Окончательный этап промывания проводят в буфере 4x SSC. Из 50000 скринированных рекомбинантных фагов, было выделено 11 позитивных клонов.

3. Идентификация кДНК позитивных клонов

кДНК вставка позитивных клонов является транс-клонированной согласно стандартным методам в коммерчески доступных секвенированных векторах M13 mp 18 и M13 mp 19 (Messing, J., Meth.Enzym.

101:20-769 (1983) и секвенирована согласно дидеоксинуклеотидному методу [Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467 (1977)].

Сравнение нуклеотидных последовательностей индивидуальных клонов с нуклеотидной последовательностью гена кДНК для t-РА человека [Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Har-kins, R.N., Vahar, G.A., Ward, C.A., Bennet, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L. and Goeddel, D.V.Nature 303: 214-221 (1983)] дает высокую степень идентичности последовательности (>80%). Последовательности выделенных белков также демонстрируют высокую идентичность последовательности с частями t-РА человека (>70%).

Ни один из клонов не содержит кДНК для полного гена плазминогенного активатора летучей мыши-вампира. Парциальные последовательности одного из этих клонов служат в качестве пробы для скрининга дополнительного банка генов кДНК из слюнных желез. (Пример 18).

Пример 18

Выделение, идентификация и секвенирование полных клонов кДНК плазминогенных активаторов из слюнных желез *Desmodus rotundus*

1. Получение банка генов кДНК из РНК слюнных желез *Desmodus rotundus*

Выделяют целую РНК из слюнных желез летучих мышей-вампиров (*D.rotundus*) путем разложения изотиоцианатом гуанидина и последующим ультрацентрифугированием посредством хлоридцезиевой прокладки (I). Из трех миллиграмм лиофилизованной целой РНК получают 80 мг поли А⁺ РНК путем дважды проведенной аффинной хроматографии на олигодеокситимидиновой целлюлозе (2,3). Пять микрограмм этого препарата использовано для синтеза кДНК согласно методу Габлера и Хоффмана (4) с некоторыми модификациями "LAP-cDNA" Synthesis Kit, Stra-tagene (5,6). Синтез первой нити начинают с помощью олигонуклеотида, содержащего олиго-деокситимидиновую пропорцию и узнавание последовательности рестрикционной эндонуклеазы XhoI (6), и проводят путем обратной транскриптазы вируса лейкемии Moloney *mirine* с использованием 5-метилдеоксицитина. Вторую нить синтезируют с помощью *E.coli* ДНК полимеразы I в присутствии *E.coli* рибонуклеазы H. Концы образованной таким путем двойной нити кДНК сглаживают Т4 ДНК полимеразой и затем связывают с EcoRI адаптерами с использованием Т4 ДНК липазы. Результирующие концы ДНК фосфолируют с помощью Т4 полинуклеотидной киназы. После гидролиза кДНК с рестрикционным ферментом XhoI, проводят гель-фильтрацию на "Сефарозе" CL-4B (Pharmacia). Комбинируют фракции, содержащие кДНК с минимальным размером 500 пар оснований; масса составляет около 1,2 мг кДНК. Одну треть этого количества получают для связывания с 3 мг EcoRI-XhoI гидролизованными рестрикцией и дефосфолированными ветвями вектора Uni-LAP(TM)XP бактериофага (дополнительный патент) фирмы Stratagene (La Jolla, USA) (5,7). Дозу лигирования упаковывают в семь отдельных доз с использованием "Gigapack" II Cold Packaging экстрактов (Stratagene) (8). Таким путем получают первичный банк генов кДНК с более чем 4x10⁶ рекомбинантных лямбда-бактериофагов.

2. Идентификация клонов кДНК плазминогенных активаторов из слюны летучей мыши-вампира *Desmodus rotundus*

Пробой, используемой для идентификации клонов полной кДНК, является фрагмент ДНК, полученный рестрикционным разложением AluI-BamHI, длиной 76 пар оснований (нуклеотид 141-216 на рисунке 26с) из 5'-конца клона, выделенного из первого банка гена кДНК (см.пример 17). Этот фрагмент метят радиоактивно никтрансляцией (9) в присутствии [α -³²P] трифосфата деоксиаденозина и используют для гибридизации "реплика" фильтров, на которых иммобилизуют ДНК из, общей сложностью, 1,2x10⁵ рекомбинантных бактериофагов первичного банкгенов кДНК. (10). Температура гибридизации и промывания составляет 50°C. Окончательная промывка проводится в буфере 2xSSC (10). Более чем 200 клонов испускают сигнал при ауторадиографии на "Replika" фильтрах, 50 клонов очищены путем отдельного засева на планшетах и повтора гибридизации на планшетах-фильтрах. Таким путем выделяют 38 клонов, которые при повторном скрининге дают четкий позитивный сигнал.

3. Идентификация и секвенирование клонов кДНК

Плазмиду рBluescript SK, содержащуюся в изолированных позитивных кломах бактериофага UnitLAP(TM)XP, являющуюся составной частью фрагмента кДНК, интегрированного в том же сегменте бактериофага, выделяют из бактериофага так называемым "иссечением *in vivo*" (7,14), получая таким образом в общем 35 различных клонов плазмид рBluescript SK, происходящими из позитивных клонов бактериофага. Плазмиды изолируют в соответствии с методом Бирнбойма и Долли (II), а их кДНК пропорцию делят на четыре различных класса α_1 , α_2 , β , γ в соответствии с анализом рестрикции с ферментами BamHI и PstI (фиг.25) и ДНК секвенированием 5'-концов. Пропорции кДНК самых длинных кДНК клонов из всех четырех классов субклонировать в векторах M13 mp19 бактериофага (12) и секвенируют дидеоксинуклеотидным методом Зангера (набор "Секвеназа", United States Biochemical Corporation, Кливленд, США). (13, 15) используя, частично, олигонуклеотидные праймеры, которые специально синтезируют для этой цели и которые являются комплементарными последовательностями кДНК пропорций. Полные последовательности кДНК (включая короткий сегмент полиА цепочек, присутствующих на 3'-конце) с выделенными таким путем дебеликовыми последовательностями представлены на фиг. 26 а, b, c, d.

Фиг.25. Образец рестрикции отобранных клонов плазмиды рBluescript с соответственно самыми длинными пропорциями кДНК из четырех групп альфа I (2 плазмидных клон), альфа 2 (1 плазмидный клон), бета (4 плазмидных клон) и гамма (1 плазмидный клон). Плазмидные ДНК препараты, гидролизованные рестрикционными ферментами BamHI ("B"), PstI ("P") или смесью двух рестрикционных ферментов ("BP"), были разделены на 1,8% гель-агарозе. Критерий размера представлен плазмидой рBP322 ("M", марке молекулярного веса ДНК 5 фирмы Boehringer-Mannheim), гидролизованной ферментом рестрикции HaeIII. Размер четко видимых фрагментов составляет 587, 540, 504, 458, 434, 267,

234, 213, 192 до 184 и 123 пар оснований (от вершины до основания) . После электрофоретического разделения гель-агароза был окрашен этилиумбромидом и сфотографирован. Из групп альфа I и бета левые наиболее окрашенные клоны были, соответственно, секвенированы.

Рис.26а: полная ДНК последовательность встройки кДНК наиболее длинного плазмидного клона в группе альфа-1 с выделенной аминокислотной последовательностью. Кодированная последовательность начинается с нуклеотида 94 (ATG...) и заканчивается терминирующим кодоном на нуклеотиде 1527 (...TAA). Выделенная аминокислотная последовательность указана в однобуквенном коде, каждая аминокислота расположена под первым нуклеотидом триплета, которым она кодируется.

Фиг.26b: полная ДНК последовательность встройки кДНК плазмидного клона типа альфа-2 с выделенной аминокислотной последовательностью. Кодированная последовательность начинается нуклеотидом 85 (ATG...) и заканчивается терминирующим кодоном на нуклеотиде 1518 (...TAA). Выделенная аминокислотная последовательность указана в однобуквенном коде, каждая аминокислота расположена под первым нуклеотидом триплета, которым она кодируется.

Фиг.26с: полная последовательность ДНК встройки кДНК наиболее длинного обнаруженного плазмидного клона в группе бета с выделенной аминокислотной последовательностью. Кодированная последовательность начинается нуклеотидом 117(ATG...) и заканчивается терминирующим кодоном на нуклеотиде 1412 (...TAA). Выделенная аминокислотная последовательность указана в однобуквенном коде, каждая аминокислота расположена под первым нуклеотидом триплета, который ее кодирует.

Фиг. 26d: полная ДНК последовательность встройки кДНК плазмидного клона типа гамма с выделенной аминокислотной последовательностью. Кодированная последовательность начинается нуклеотидом 180 (ATG...) и заканчивается терминирующим кодоном на нуклеотиде 1364 (...TAA). Выделенная аминокислотная последовательность указана в однобуквенном коде, каждая аминокислота расположена под первым нуклеотидом триплета, который ее кодирует.

Пример 19

Конструирование векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие активное вещество V-PA, и тестирование их путем микроинъекции в ооциты

Кодирующие последовательности из кДНК клонов форм V-PA α_1 , α_2 , β , и получены путем гидролиза с рестрикционной эндонуклеазой EcoRI, и после обработки фрагментом Кленова E.coli ДНК полимеразы I, а также выделения из агароза-гелей с низкой температурой плавления, вшиты в сайт XbaI вектора pSVL-EcoRI, наполненный фрагментом Кленова E.coli ДНК полимеразы I и обработаны фосфатазой кишечника телят (Boehringer Mannheim). Правильная ориентация проверена BamHI. pSVL-EcoRI поражает производную коммерчески доступной SV40 экспрессионной плазмиды pSVL (Pharmacia) (см. приложение).

Полученные таким путем векторы экспрессии очищают на градиенте хлорида цезия и используют для микроинъекции в ооциты.

Инъекция ооцитов осуществляется согласно следующим перечисленным статьям.

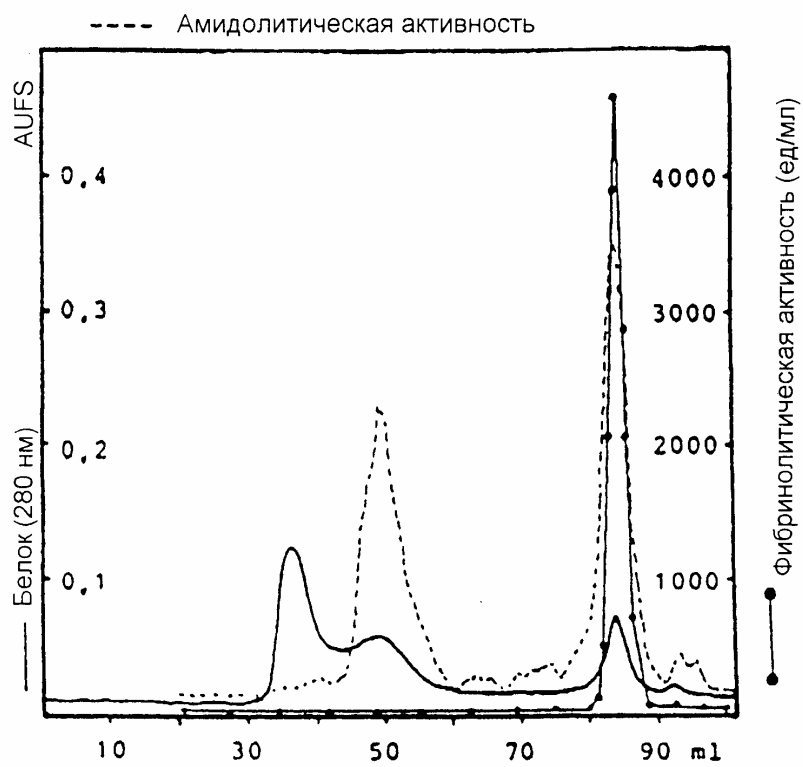
После внедрения культуры ткани в среду ооцитов, инъецированных векторами экспрессии V-PA, на фибриновом планшете, полученном с помощью среды Барта (см. литературу по п.2), образуются ореолы лизиса. Если вместо фибрин-планшета использовать казеин-планшет, то лизис не происходит (α_1 , α_2 , β) . Ооциты, инъецированные вектором, не содержащим последовательность V-PA, не дают ореола лизиса.

кДНК последовательности V-PA содержат функциональную сигнальную пептидную последовательность, ответственную за вынос белка V-PA за пределы клетки.

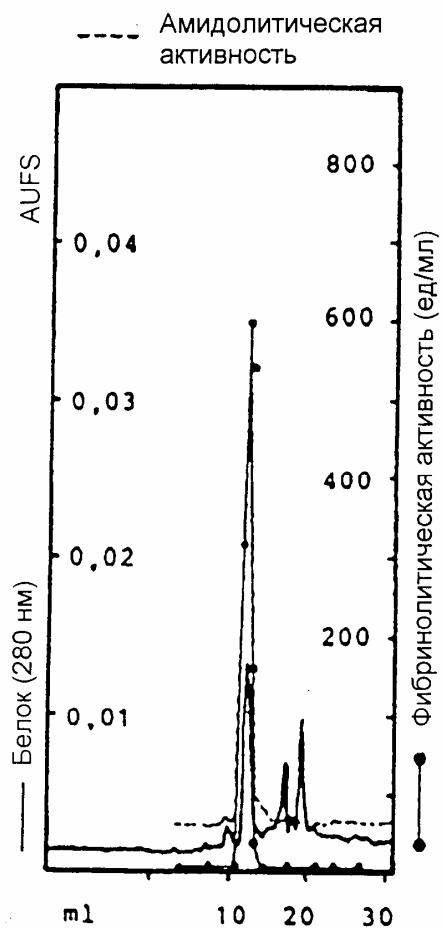
Эти результаты ясно показывают, что полученные таким путем клоны кДНК V-PA являются полными и после встройки в подходящий вектор экспрессии вырабатывают активное эффективное вещество, которое является абсолютно фибрин-специфичным.



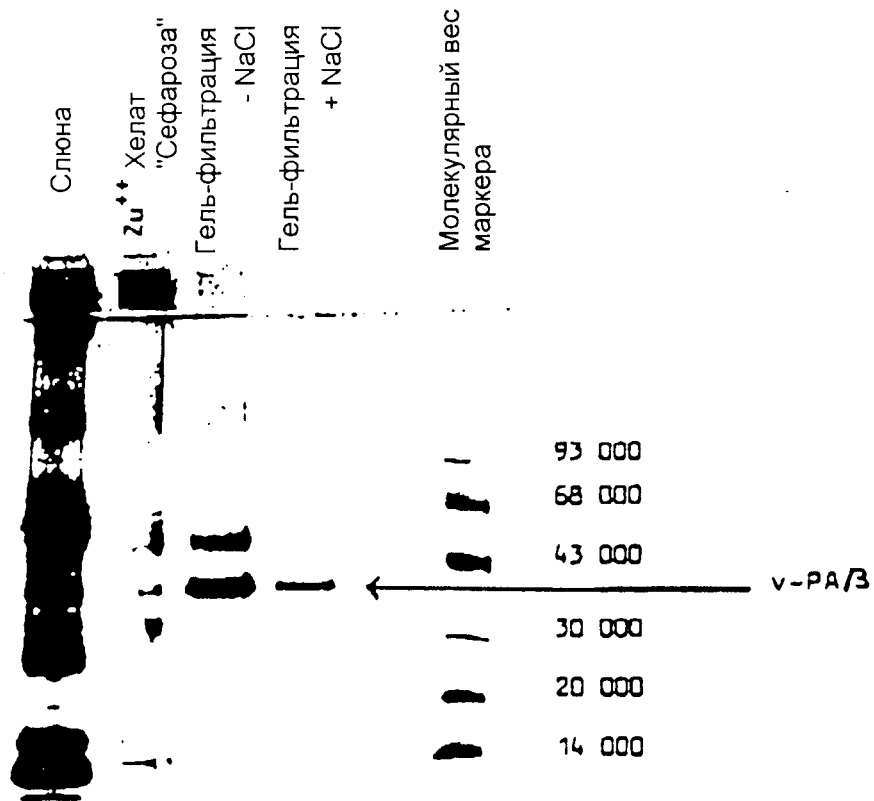
Фиг. 1



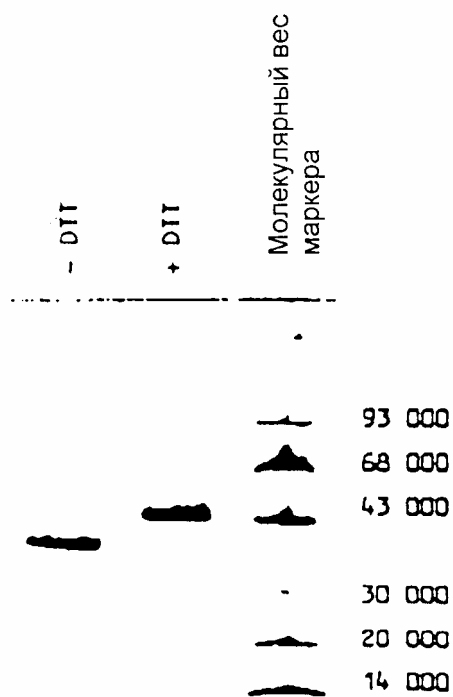
Фиг. 2



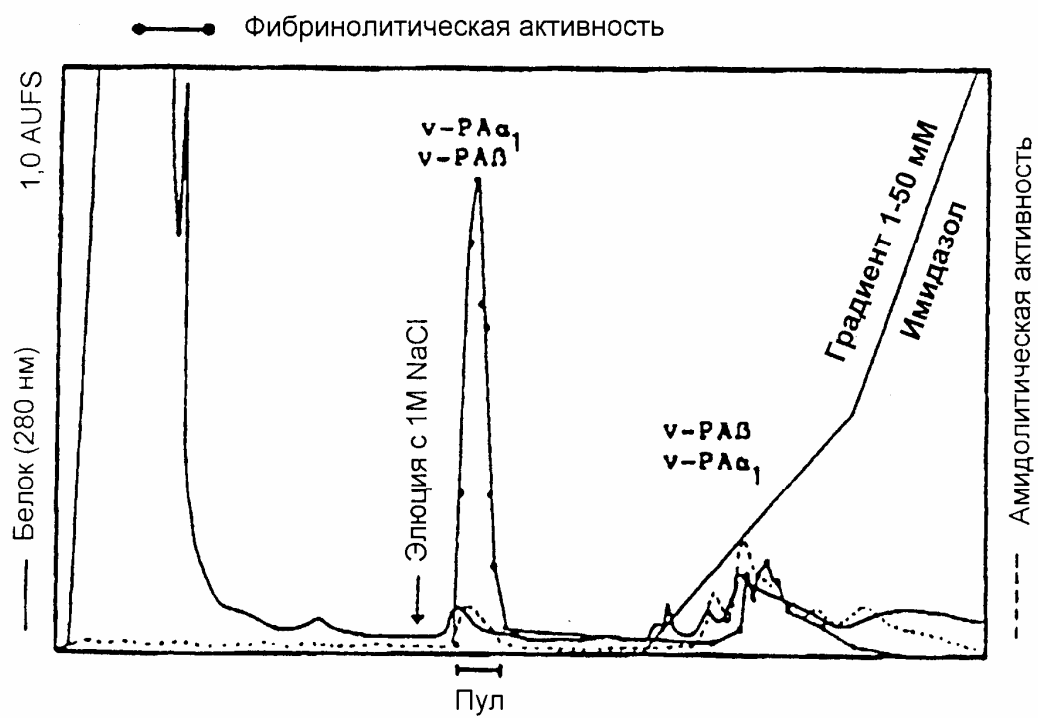
Фиг. 3



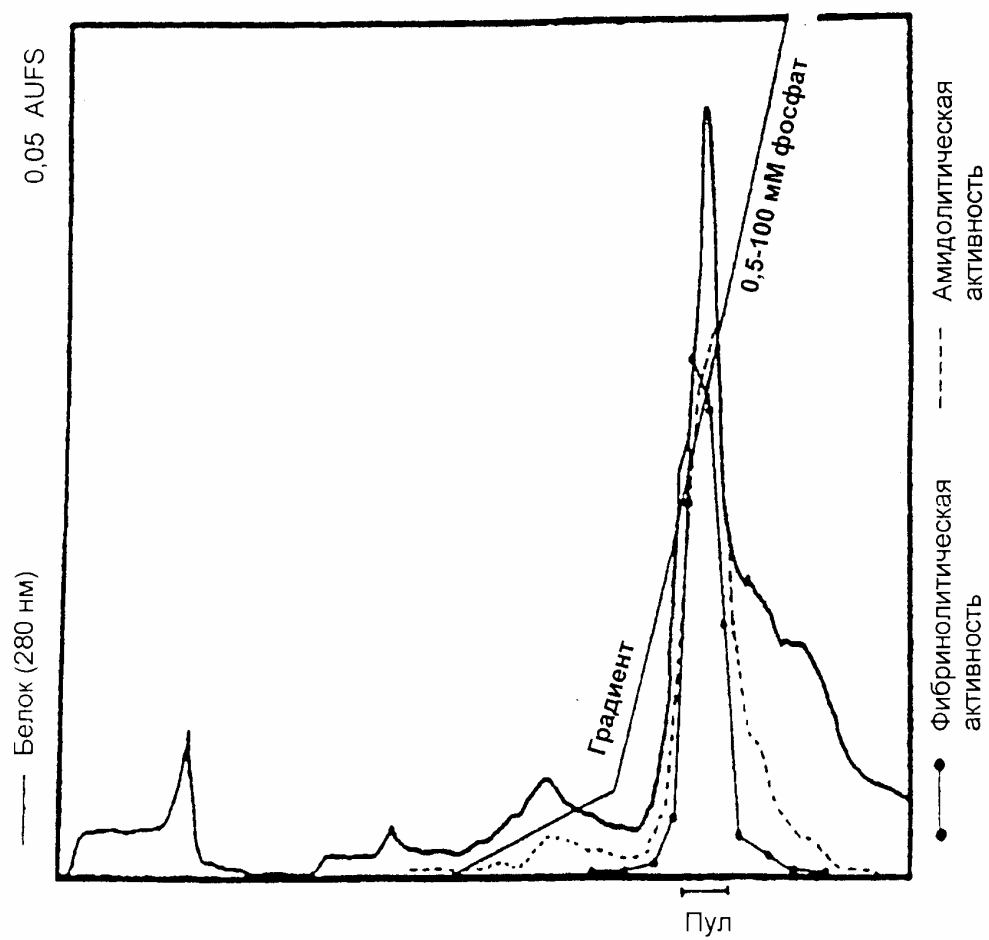
Фиг. 4А



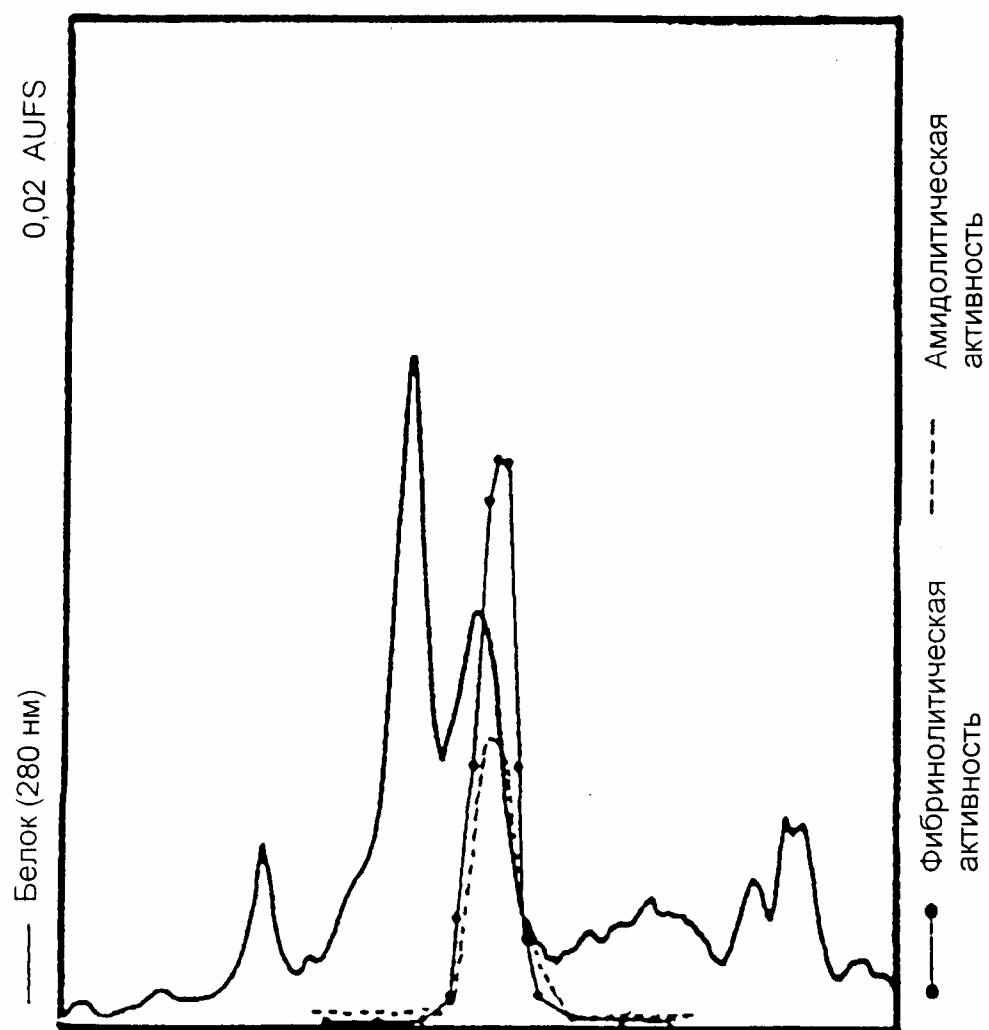
Фиг. 4В



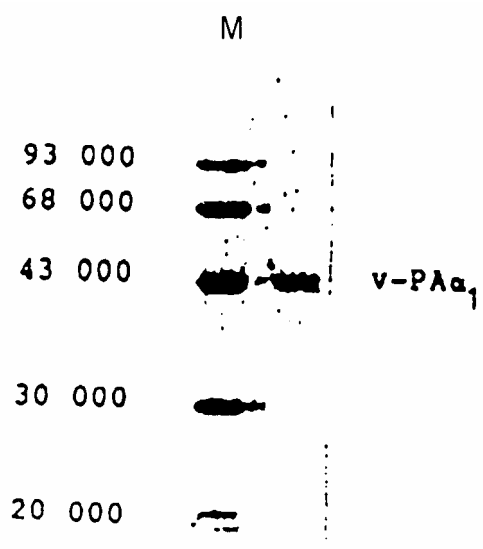
Фиг. 5



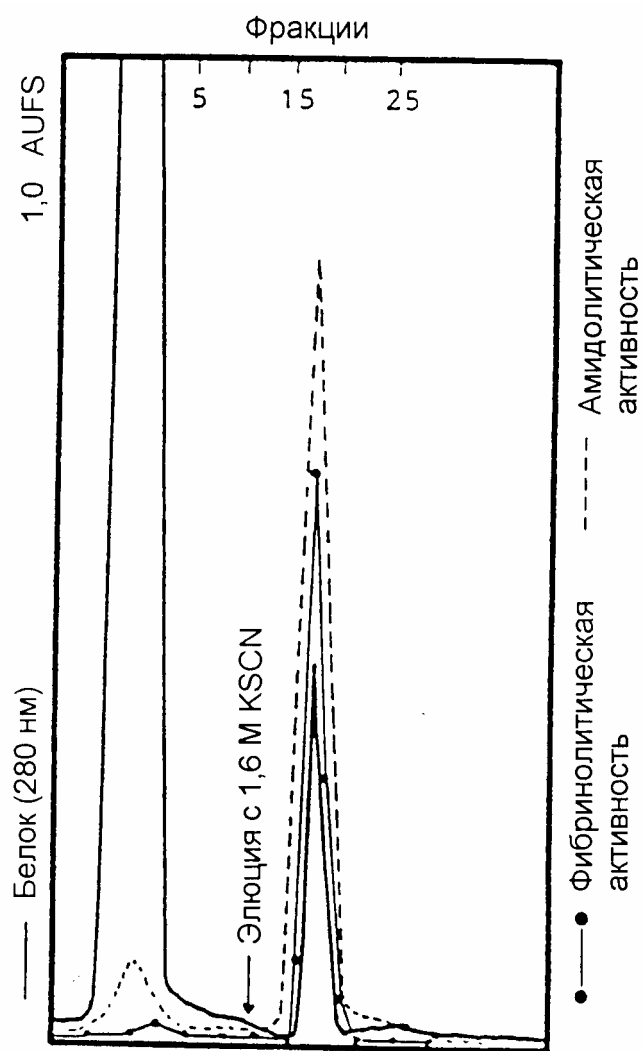
Фиг. 6



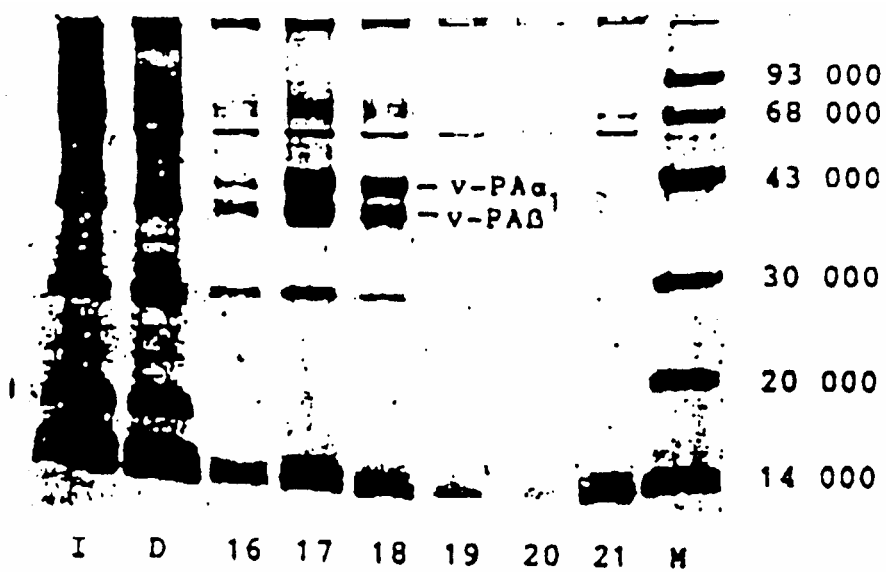
Фиг. 7



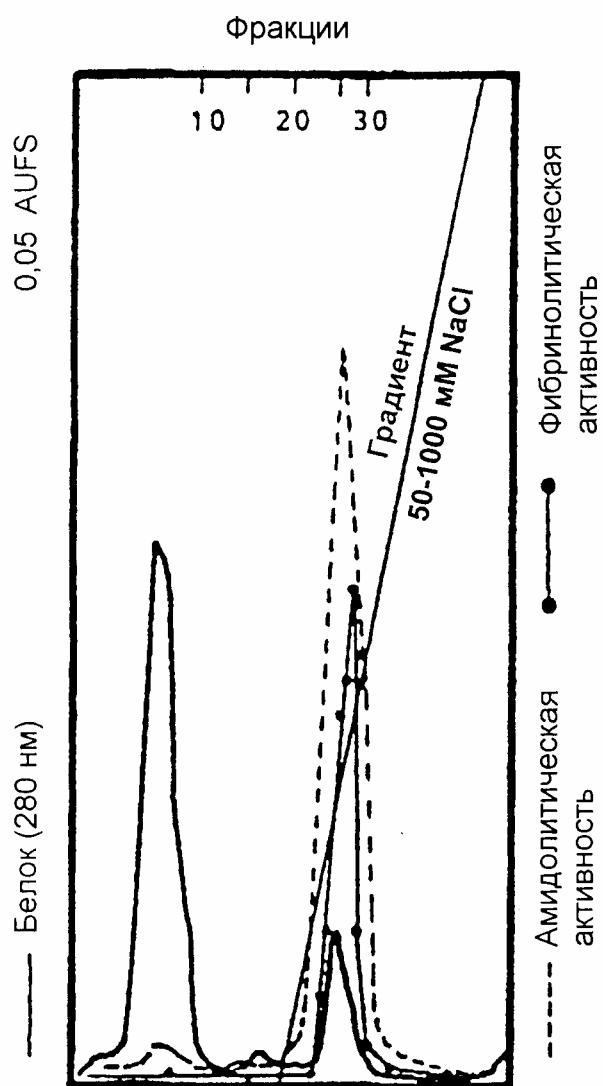
Фиг. 8



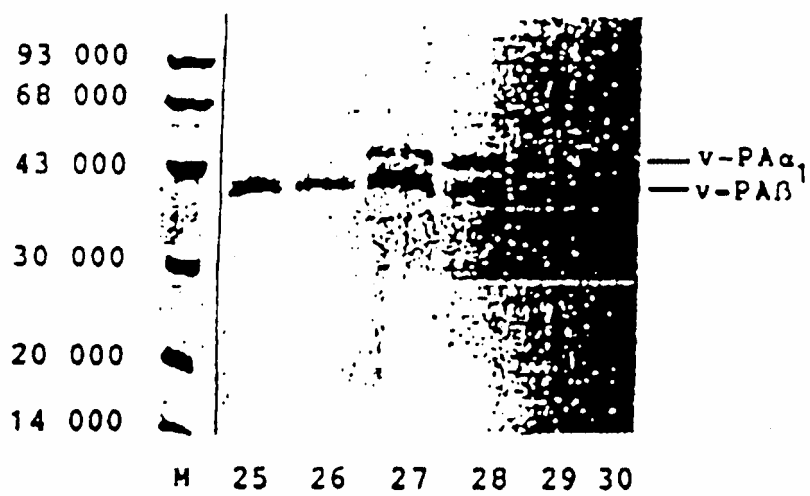
Фиг. 9



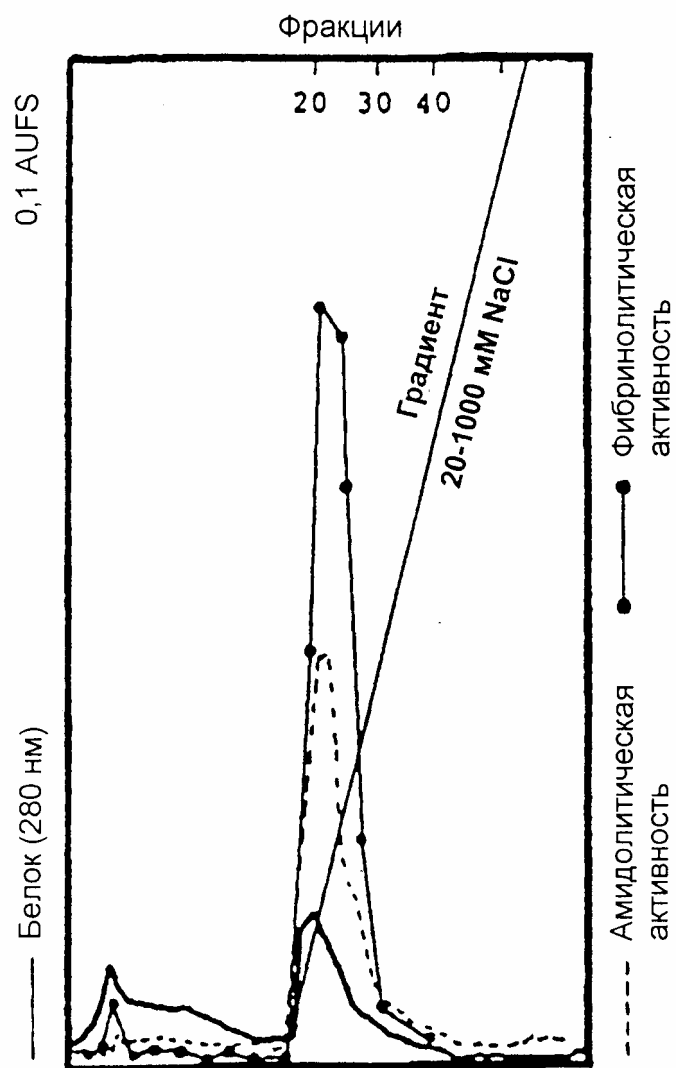
Фиг. 10



Фиг. 11

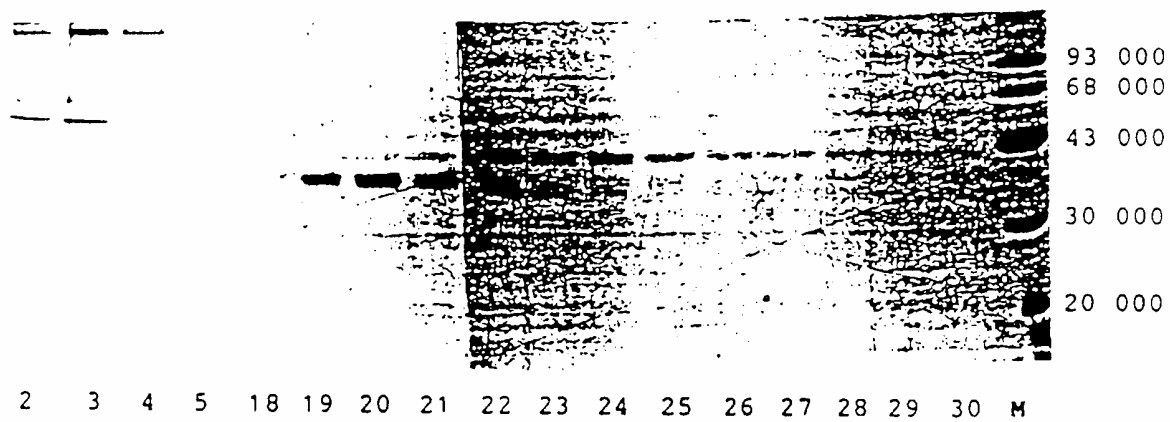


Фиг. 12

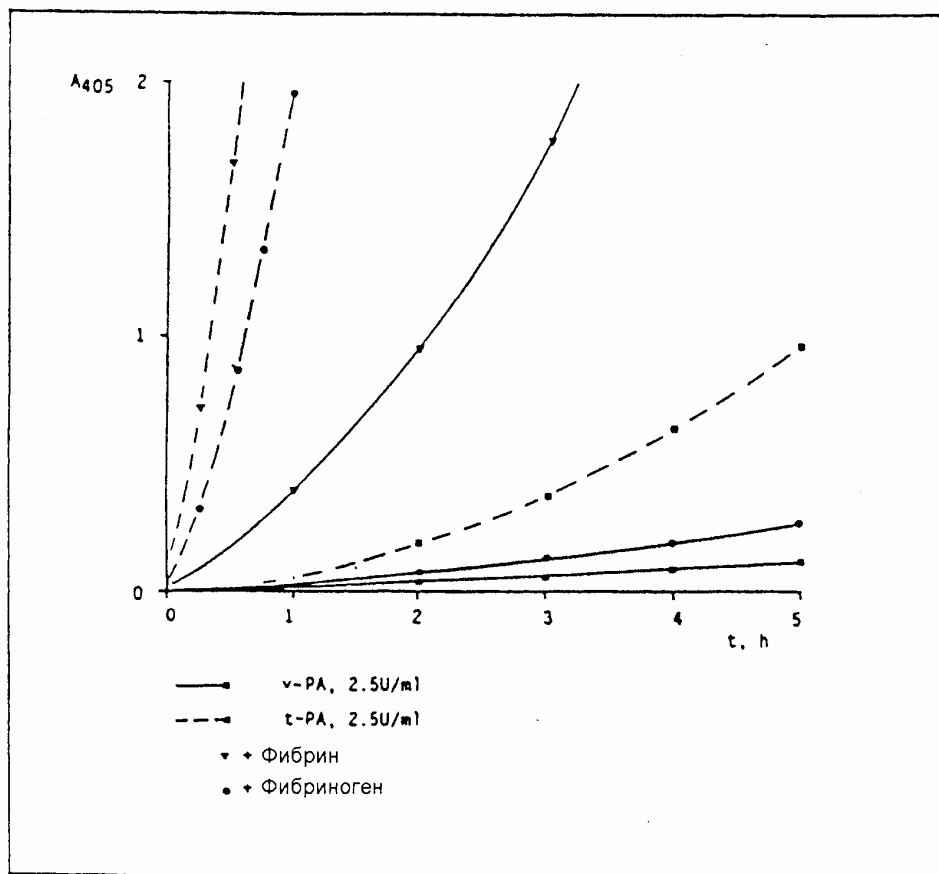


Фиг. 13

V-РА содержащие фракции подвергают электрофору на полиакриламидном геле додецилсульфатнатрия (фиг. 14)



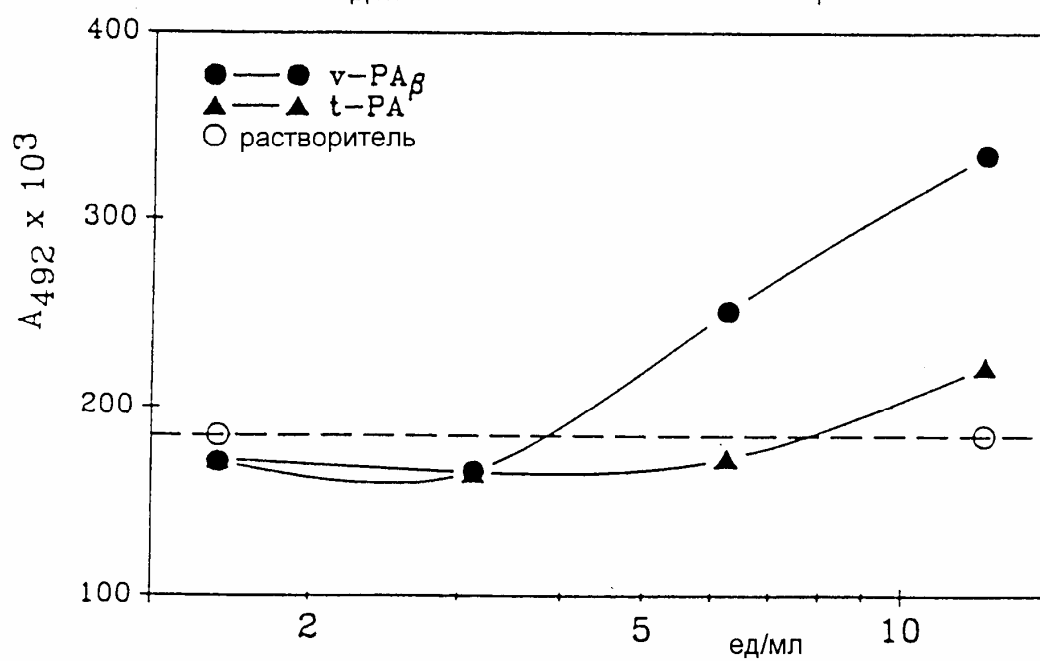
Фиг. 14



Фиг. 15

ЛИЗИС СГУСТКА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

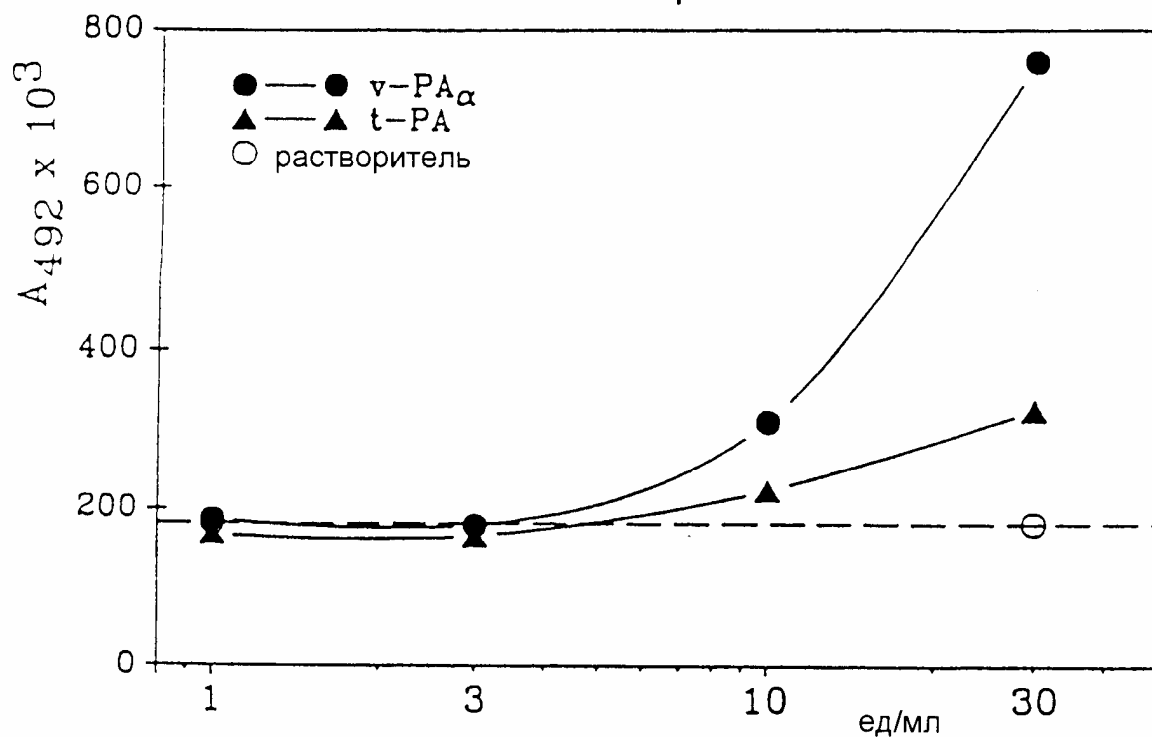
Действие плазминогенных активаторов



Фиг. 16А

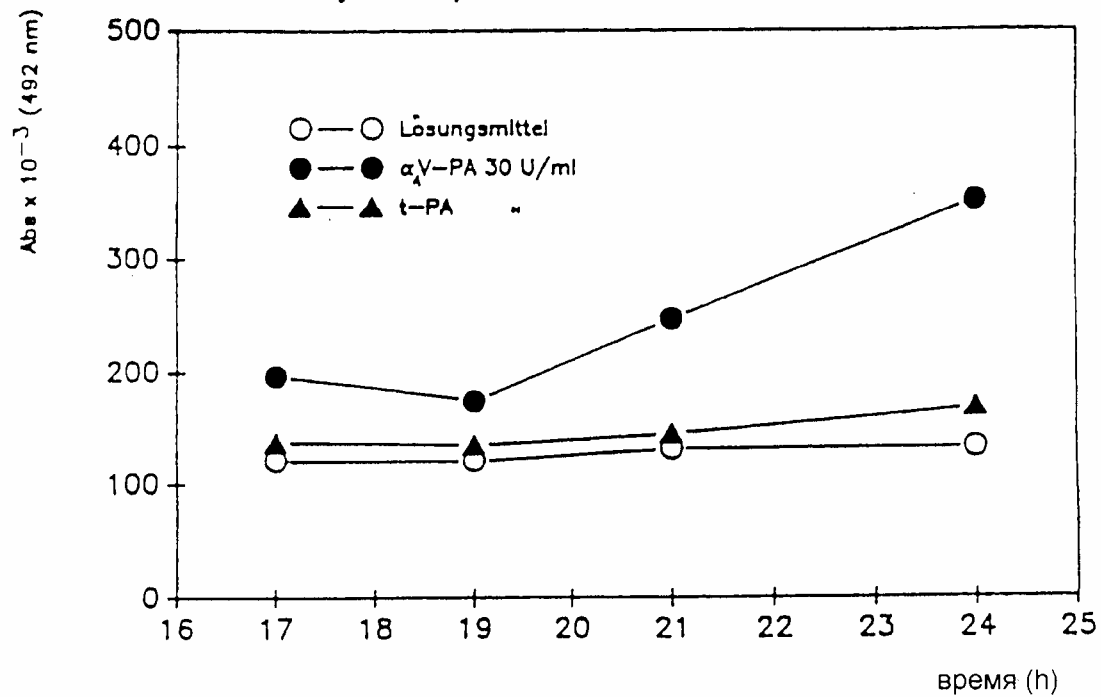
ЛИЗИС СГУСТКА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА in vitro

Влияние активаторов плазминогена

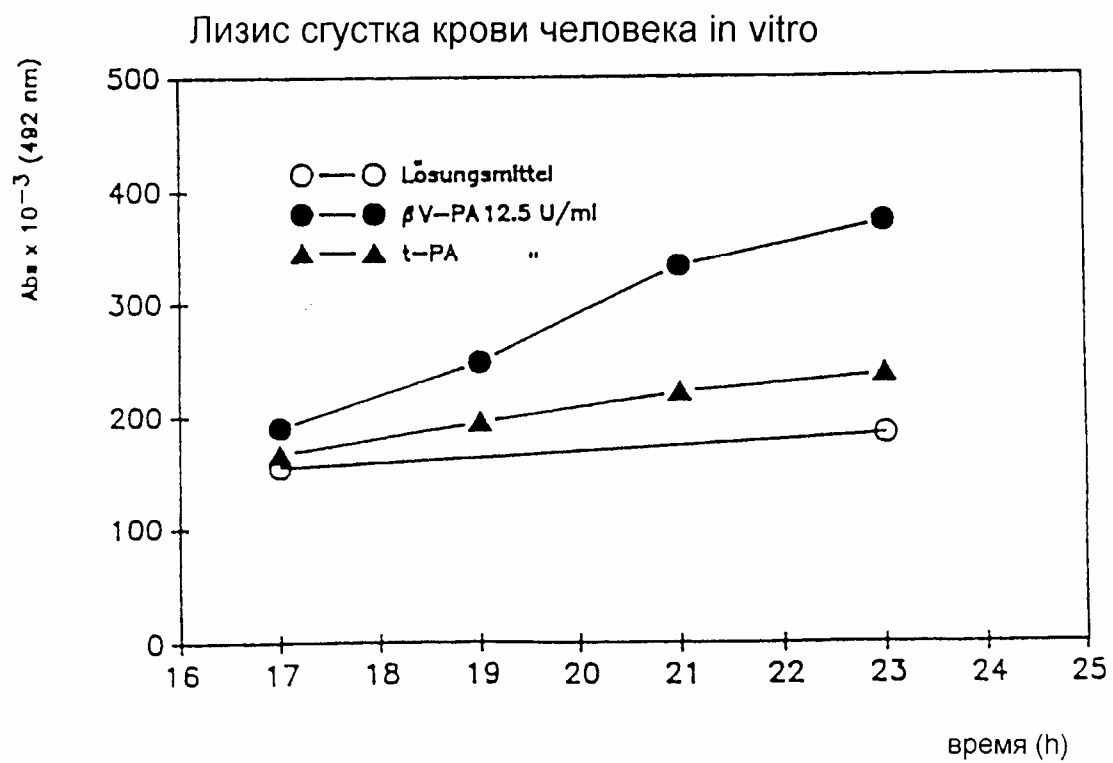


Фиг. 16В

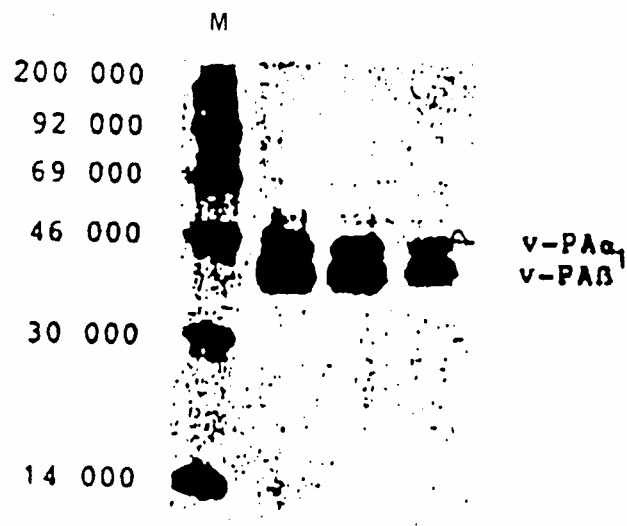
Лизис сгустка крови человека in vitro



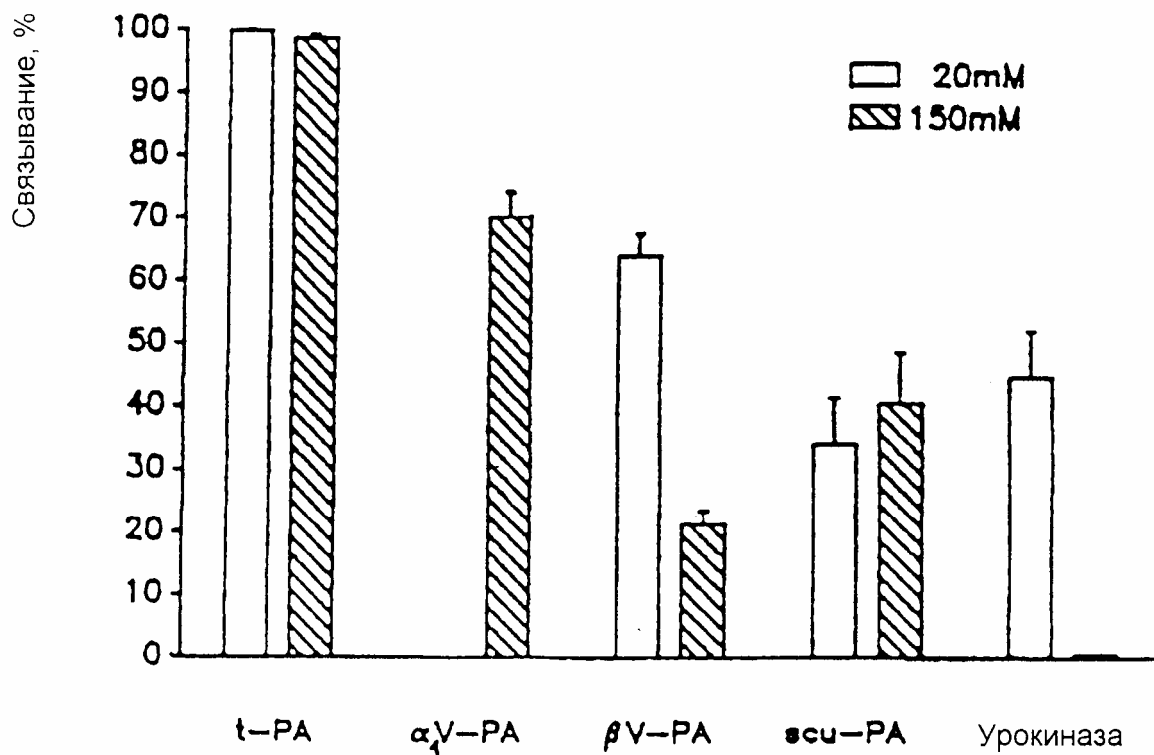
Фиг. 17А



Фиг. 17В

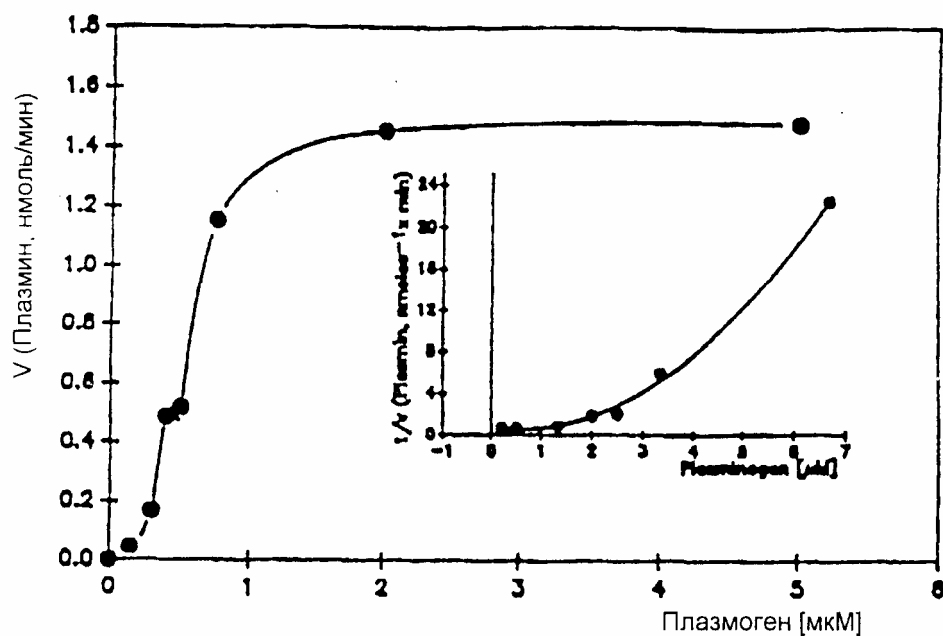


Фиг. 18



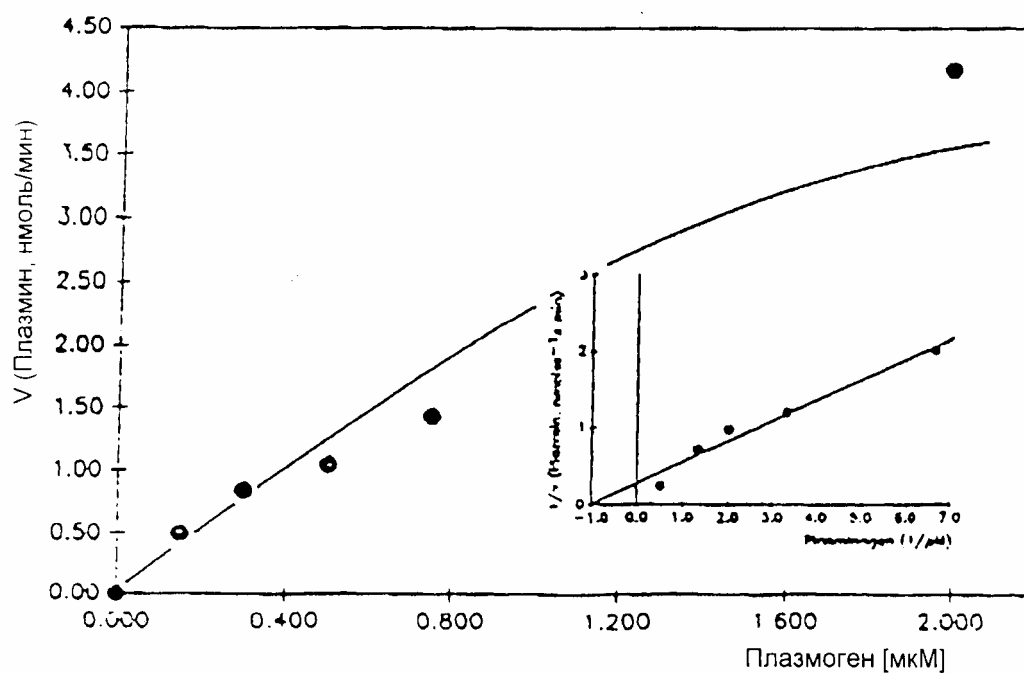
Фиг. 19

Кинетика активации Glu-плазминогена
природным V-PA β + мономеры

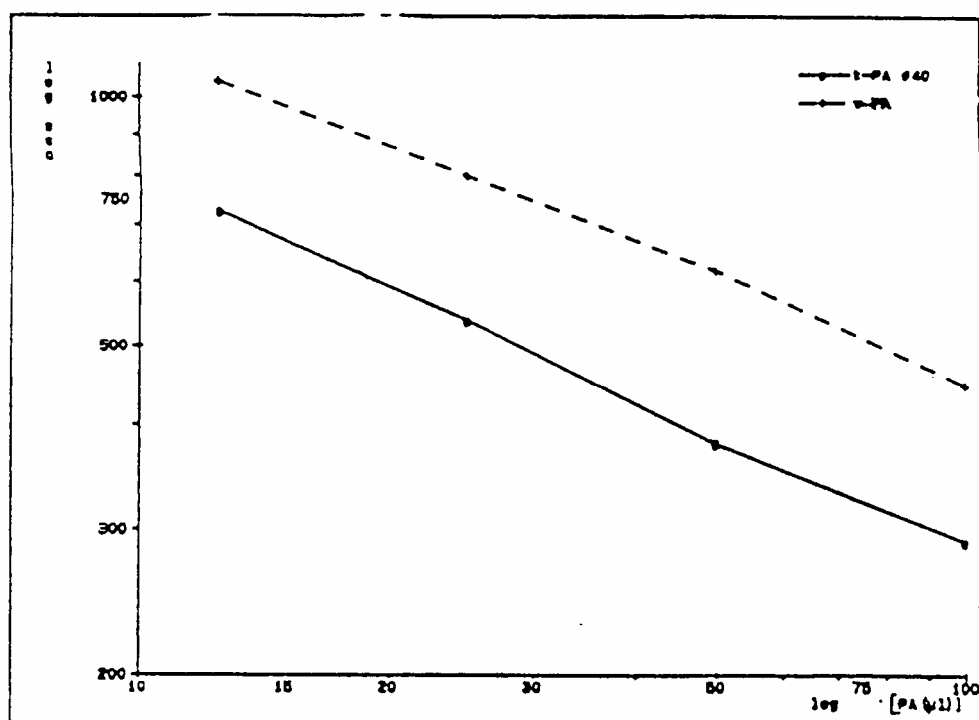


Фиг. 20

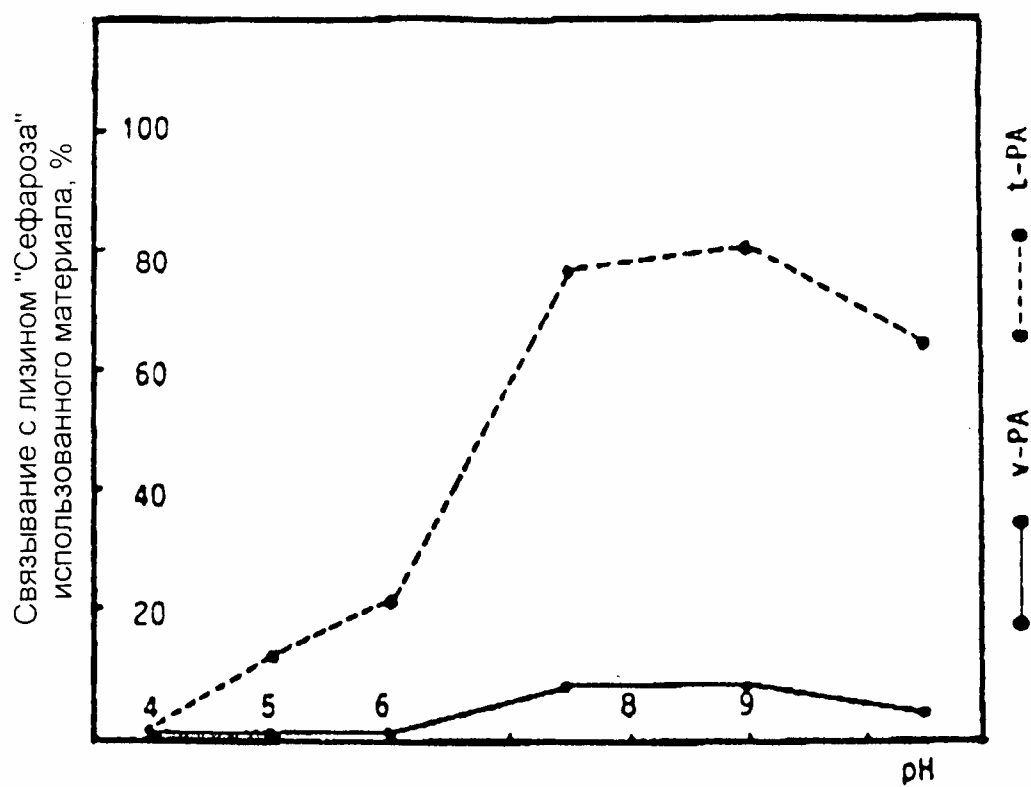
Кинетика активации Glu-плазминогена t-PA + мономеры



Фиг. 21

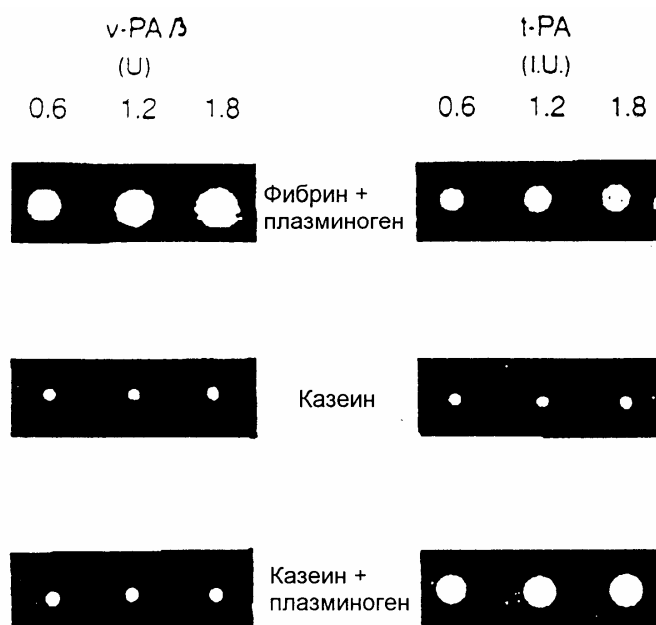


Фиг. 22

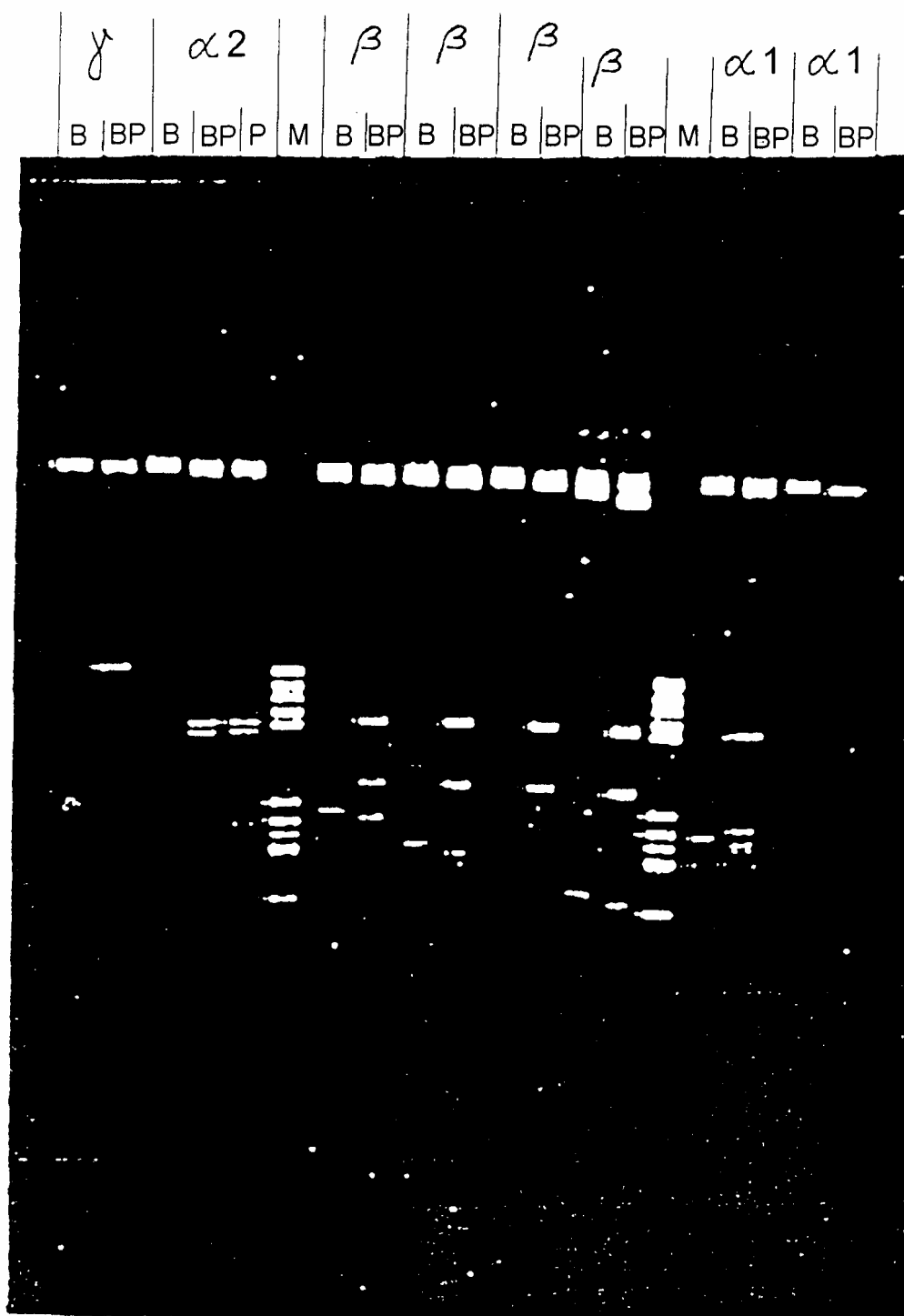


Фиг. 23

Специфичность фибрина V-PA и t-PA



Фиг. 24



Фиг. 25

1	GGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGG	60
61	CAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTG	120
	M V N T M K T K L	
121	TTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCCAGGCAGGAAACCTACAGG	180
	L C V L L L C G A V F S L P R Q E T Y R	
181	CAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGTGGCCTGCAAAGACGAAATAACCCAGATG	240
	Q L A R G S R A Y G V A C K D E I T Q M	
241	ACATACCGGCGACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTCAGAAGCAAGCGGGTGGAAACAC	300
	T Y R R Q E S W L R P E V R S K R V E H	
301	TGCCAGTGCATAGAGGCCAGGCCCCGGTGCCACACCGTGCCCGTCAACAGTTGCAGTGAA	360
	C Q C D R G Q A R C H T V P V N S C S E	
361	CCAAGGTGCTTCAATGGGGGGACATGCTGGCAGGCTGTATATTTCTCAGACTTTGTCTGT	420
	P R C F N G G T C W Q A V Y F S D F V C	
421	CAGTGCCTGTCAGGATATACGGGGAAACGGTGTGAAGTAGATACCCGTGCCACCTGCTAT	480
	Q C P A G Y T G K R C E V D T R A T C Y	
481	GAGGGCCAGGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACAGCAGAAAGTAGGGTTGAGTGT	540
	E G Q G V T Y R G T W S T A E S R V E C	
541	ATCAACTGGAACAGCAGCCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGATGCCAGATGCC	600
	I N W N S S L L T R R T Y N G R M P D A	
601	TTCAACCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAAATGGAGCCCCAAAACCT	660
	F N L G L G N H N Y C R N P N G A P K P	
661	TGGTGCTATGTTCATCAAGGCAGGGAAGTTCACCTCGGAGTCCTGTAGCGTGCCTGTCTGC	720
	W C Y V I K A G K F T S E S C S V P V C	
721	TCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAGGAGGA	780
	S K A T C G L R K Y K E P Q L H S T G G	
781	CTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACAGAAGG	840
	L F T D I T S H P W Q A A I F A Q N R R	
841	TCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGGTCTGACT	900
	S S G E R F L C G G I L I S S C W V L T	
901	GCTGCCCCACTGCTTCCAGGAGAGCTATCTTCCTGACCAGCTTAAGGTGGTTTTGGGCAGA	960
	A A H C F Q E S Y L P D Q L K V V L G R	
961	ACATACCGGGTGAAACCTGGAGAGGAAGAGCAGACATTTAAAGTCAAAAAATACATCGTC	1020
	T Y R V K P G E E E Q T F K V K K Y I V	
1021	CATAAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGAAATCG	1080
	H K E F D D D T Y N N D I A L L Q L K S	
1081	GACTCACCACAGTGTGCCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGGAAGCC	1140
	D S P Q C A Q E S D S V R A I C L P E A	
1141	AACCTGCAGCTGCCCCGACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATAAGTCA	1200
	N L Q L P D W T E C E L S G Y G K H K S	
1201	TCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGC	1260
	S S P F Y S E Q L K E G H V R L Y P S S	

Фиг. 26а

1261	CGCTGCGCACCCAAGTTTCTGTTTAACAAAACCGTTACAAACAACA CTGTCTGCTCGA	1320
	R C A P K F L F N K T V T N N M L C A G	
1321	GACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGA	1380
	D T R S G E I Y P N V H D A C Q G D S G	
1381	GGCCCCCTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTGGGGT	1440
	G P L V C M N D N H M T L L G I I S W G	
1441	GTTGGCTGTGGGGAGAAAGACGTTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACCTAGGC	1500
	V G C G E K D V P G V Y T K V T N Y L G	
1501	TGGATTTCGAGACAACATGCACCTGTAACCAAGAACACACAACCTCCCTGGCAGCCCCTGCC	1560
	W I R D N M H L	
1561	TTCTCCAGCCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCCACAAG	1620
1621	CCTGCACACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAGAGGGTATACTTCCAC	1680
168	AGGTACTTCCCACCTTCATAAGTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAAATCCATTTCTGT	1740
1741	CAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCAGAACACCACCATCTAGGGCAGACAA	1800
1801	GAGGTAGAATAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACATGAGCAGCTTTGGAAATGGGAC	1860
1861	CACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAAGTATC	1920
1921	ACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACGCCCAACAGCGACCTGGGCCTC	1980
1981	CTAACAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCCTCAGGCCATCCTTTAAGTATTTG	2040
2041	ACTATCCTCTTTCTACAGCTCTTGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAATCTTTTT	2100
2101	CCTTTATAAACTTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTTCTGATAACTGCTAAACTAGGCTTT	2160
2161	AGCATTTTGTATATCAATCCATTGTAGTTGCCACGACTCTGTATTATACTACACTGGAAAA	2220
2221	ATAAATTCAGGCATATTTTTTCACTTAAAAAAA 2252	

Фиг. 26а (продолжение)

1	GCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTG	60
61	GCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTA	120
	M V N T M K T K L L C V	
121	CTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGTTGCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCA	180
	L L L C G A V F S L P R Q E T Y R Q L A	
181	AGGGGATCCAGAGCATATGGTGTGGCCTGCAGAGACGAAAAAACCCAGATGATATACCAG	240
	R G S R A Y G V A C R D E K T Q M I Y Q	
241	CAACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTGAGAAGCAAGCGGGTAGAACACTGCCGGTGC	300
	Q Q E S W L R P E V R S K R V E H C R C	
301	GATAGAGGATTGGCCCAGTGTACACCGTGCCTGTCAAAAGTTGCAGTGAAGTGAAGGTGC	360
	D R G L A Q C H T V P V K S C S E L R C	
361	TTCAATGGGGGGACATGCTGGCAGGCTGCATCTTTCTCAGACTTTGTCTGTCACTGCCCT	420
	F N G G T C W Q A A S F S D F V C Q C P	
421	AAAGGATATACGGGGAAACAGTGTGAAGTAGATACCCATGCCACCTGCTACAAGGACCAG	480
	K G Y T G K Q C E V D T H A T C Y K D Q	
481	GGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGGAAAGTGGGGCTCAGTGTATCAACTGG	540
	G V T Y R G T W S T S E S G A Q C I N W	

Фиг. 26b

541 AACAGCAACCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGAGGTCAGATGCCATCACACTG 600
N S N L L T R R T Y N G R R S D A I T L
601 GGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAGATAACAACCTCAAACCTTGGTGCTAT 660
G L G N H N Y C R N P D N N S K P W C Y
661 GTCATCAAGGCAAGCAAGTTCATCTTGGAGTTCTGTAGCGTGCCTGTCTGCTCCAAGGCC 720
V I K A S K F I L E F C S V P V C S K A
721 ACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAGGAGGACTCTTCACA 780
T C G L R K Y K E P Q L H S T G G L F T
781 GACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACAGAAGGTCATCAGGA 840
D I T S H P W Q A A I F A Q N R R S S G
841 GAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCTGCTGGGTCTGACTGCTGCCCCAC 900
E R F L C G G I L I S S C W V L T A A H
901 TGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTAGGGTGGTTTGGGGCAGAACATAACCGG 960
C F Q E R Y P P Q H L R V V L G R T Y R
961 GTGAAACCTGGAAAGGAAGAGCAGACATTTGAAGTCGAAAAATGCATCGTCCATGAGGAA 1020
V K P G K E E Q T F E V E K C I V H E E
1021 TTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGAAATCGGGCTCGCCA 1080
F D D D T Y N N D I A L L Q L K S G S P
1081 CAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGGAAGCCAACCTGCAG 1140
Q C A Q E S D S V R A I C L P E A N L Q
1141 CTGCCCCACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATAAGTCGTCTTCTCCT 1200
L P D W T E C E L S G Y G K H K S S S P
1201 TTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTGAGGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCACA 1260
F Y S E Q L K E G H V R L Y P S S R C T
1261 TCGAAGTTTCTGTTTACAAAACCGTCACAAACAATGCTGTGTGCTGAGACACGCGG 1320
S K F L F N K T V T N N M L C A G D T R
1321 AGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGAAGTACAGGAGGCCCTTG 1380
S G E I Y P N V H D A C Q G D S G G P L
1381 GTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTGGGGTGTGGCTGT 1440
V C M N D N H M T L L G I I S W G V G C
1441 GGGGAGAAAGACATTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACCTAGGCTGGATTGGA 1500
G E K D I P G V Y T K V T N Y L G W I R
1501 GACAACATGCGCCCATACCAAGAACACGCAACTCCCTGGCAGCCCCTGCCTTCTCCAC 1560
D N M R P
1561 CCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCTGACACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCACAC 1620
1621 AGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAAAGGGTGTACTTCCACAGGTACTTC 1680
1681 CCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAATCCATTTCTGTCAGACAAGA 1740
1741 AGACAGATAAATGCCAACCCCTCCCAGAACACCACCATCTAGGGCAGACAAGAGGTAGAA 1800
1801 TAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGCAGCTTTGGAAATGGGACCACCAAGAT 1860
1861 GAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAAGTATCACATTAGAA 1920
1921 ATAAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCAACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAGG 1980
1981 AATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCTCAGGCCATCCTTTAAGTATTTGACTACCCCC 2040
2041 TTTCTACAGCTTTTGGGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAATCTTTTTCTTTATAA 2100
2101 ACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTTCTGATAACTGCTAAACTAGGCTTTAGCATTTTG 2160
2161 ATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTATTATACTACACTGGAAAAATAAATCA 2220
2221 GGCATATTTTCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2257

Фиг. 26b (продолжение)

1	GGCCAAGGCTGTGCGGAGAGATTGGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAA	60
61	TCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAATGG	120
	M V	
121	TGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCTCGT	180
	N T M K T K L L C V L L L C G A V F S L	
181	TGCCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGGTTGCA	240
	P R Q E T Y R Q L A R G S R A Y G G C S	
241	GTGAACTGAGGTGCTTCAATGGGGGACATGCTGGCAGGCTGCATCTTTCTCAGACTTTG	300
	E L R C F N G G T C W Q A A S F S D F V	
301	TCTGTCACTGCCCTAAAGGATATACGGGGAAACAGTGTGAAGTAGATACCCATGCCACCT	360
	C Q C P K G Y T G K Q C E V D T H A T C	
361	GCTACAAGGACCAGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGGAAAGTGGGGCTC	420
	Y K D Q G V T Y R G T W S T S E S G A Q	
421	AGTGTATCAACTGGAACAGCAACCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGAGGTGAG	480
	C I N W N S N L L T R R T Y N G R R S D	
481	ATGCCATCACACTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAGATAACAACCTCAA	540
	A I T L G L G N H N Y C R N P D N N S K	
541	AACCTTGGTGCTATGTCATCAAGGCAAGCAAGTTCATCTTGGAGTTCTGTAGCGTGCCTG	600
	P W C Y V I K A S K F I L E F C S V P V	
601	TCTGCTCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAG	660
	C S K A T C G L R K Y K E P Q L H S T G	
661	GAGGACTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACA	720
	G L F T D I T S H P W Q A A I F A Q N R	
721	GAAGGTCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGATATTGATCAGTTCCTGCTGGGTCC	780
	R S S G E R F L C G G I L I S S C W V L	
781	TGACTGCTGCCCCTGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTAGGGTGGTTTTGG	840
	T A A H C F Q E R Y P P Q H L R V V L G	
841	GCAGAACATACCGGGTGAAACCTGGAAGGAAGAGCAGACATTTGAAGTCGAAAAATGCA	900
	R T Y R V K P G K E E Q T F E V E K C I	
901	TCATCCATGAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGA	960
	I H E E F D D D T Y N N D I A L L Q L K	
961	AATCGGGCTCGCCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGG	1020
	S G S P Q C A Q E S D S V R A I C L P E	
1021	AAGCCAACCTGCAGCTGCCCCGACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACGGCAAGCATA	1080
	A N L Q L P D W T E C E L S G Y G K H K	
1081	AGTCGTCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCAGGCTGTACCCCT	1140
	S S S P F Y S E Q L K E G H V R L Y P S	
1141	CCAGCCGCTGCACATCGAAGTTTCTGTTTAAACAAAACCGTCACAAACAACATGCTGTGTG	1200
	S R C T S K F L F N K T V T N N M L C A	
1201	CTGGAGACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGACT	1260
	G D T R S G E I Y P N V H D A C Q G D S	

Фиг. 26с

1261	CAGGAGGCCCCCTTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTT	1320
	G G P L V C M N D N H M I L L G I I S W	
1321	GGGGTGTGGCTGTGGGGAGAAAGACATTCCAGGTGTATACACCAAGGTTACTAATTACC	1380
	G V G C G E K D I P G V Y T K V T N Y L	
1381	TAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCGCCCATACCAAGAACACGCAACTCCCTGGCAGCCC	1440
	G W I R D N M R P	
1441	CTGCCTTCCTCCACCCCAGAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCC	1500
1501	ACAAGCCTGCACACAGTACTAGTGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAAAGGGTGTACT	1560
1561	TCCACAGGTACTTCCCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAGAATCCATT	1620
1621	TCTGTCAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCCAGAACACCACCATCTAGGGCA	1680
1681	GACAAGAGGTAGAATAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGCAGCTTTGGAAAT	1740
1741	GGGACCACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAAGAA	1800
1801	GTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCAACAGCGACCTGG	1860
1861	GCCTCCTAACAAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCTCAGGCCATCCTTTAAGT	1920
1921	ATTTGACTACCCCTTTCTACAGCTTTTGGGAAGGAATTCCTTTTGTGTACAGTATAAATC	1980
1981	TTTTTCCTTTATAAACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATTCTGATAACTGCTAAACTAG	2040
2041	GCTTTAGCATTTTGATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTATTATACTACACTG	2100
2101	GAAAAATAAATTCAGGCATATTTTTTCACTTAAAAAAA	2137

Фиг. 26с (продолжение)

1	GCTACAGAGAAGCCCCGCCCCTGTGGGCCACTGACCCCAACCCCTGCTTTGAAATACAGG	60
61	GGAGGCCGAGGCTGTGCGGAGAGATTGGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGG	120
121	AAATCCTCTCCAGGAGAGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACACCGCAGAAA	180
	M	
181	TGGTGAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAGTCTTCT	240
	V N T M K T K L L C V L L L C G A V F S	
241	CGTTGCCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCCAGAGCATATGGTGATC	300
	L P R Q E T Y R Q L A R G S R A Y G D P	
301	CCCATGCCACCTGCTACAAGGACCAGGGTGTACCTACAGGGGCACATGGAGCACATCGG	360
	H A T C Y K D Q G V T Y R G T W S T S E	
361	AAAGTGGGGCTCAGTGTATCAACTGGAACAGCAATCTTCTGATCCGGAGGACCTACAATG	420
	S G A Q C I N W N S N L L I R R T Y N G	
421	GGCGGATGCCAGAGGCCGTCAAGCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGTAGAAACCCAG	480
	R M P E A V K L G L G N H N Y C R N P D	
481	ATGGAGCCTCAAAACCTTGGTGCTATGTCATCAAGGCAAGGAAGTTCACCTCAGAGTCCT	540
	G A S K P W C Y V I K A R K F T S E S C	
541	GTAGCGTGCCTGTCTGCTCCAAGGCCACCTGTGGCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGC	600
	S V P V C S K A T C G L R K Y K E P Q L	
601	TTCACAGTACAGGAGGACTCTTCACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCT	660
	H S T G G L F T D I T S H P W Q A A I F	

Фиг. 26d

661	TTGCCCAGAACAGAAGGTCATCAGGAGAAAAGGTTCTTGTGTGGGGGAATATTGATCAGTT	720
	A Q N R R S S G E R F L C G G I L I S S	
721	CCTGCTGGGTCTGACTGCTGCCACTGCTTCCAGGAGAGGTATCCTCCCCAGCATCTTA	780
	C W V L T A A H C F Q E R Y P P Q H L R	
781	GGGTGGTTTTGGGCAGAACATACCGGGTGAAACCTGGAAAGGAAGAGCAGACATTTGAAG	840
	V V L G R T Y R V K P G K E E Q T F E V	
841	TCGAAAAATGCATCGTCCATGAGGAATTTGATGACGACACTTACAACAATGACATTGCAC	900
	E K C I V H E E F D D D T Y N N D I A L	
901	TGCTGCAGCTGAAATCGGGCTCGCCACAGTGTGCCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCA	960
	L Q L K S G S P Q C A Q E S D S V R A I	
961	TCTGTCTCCCCGAAGCCAACCTGCAGCTGCCCGACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCT	1020
	C L P E A N L Q L P D W T E C E L S G Y	
1021	ACGGCAAGCATAAGTCGTCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGGCATGTCA	1080
	G K H K S S S P F Y S E Q L K E G H V R	
1081	GGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCACATCGAAGTTTCTGTTTAACAAAACCGTCACAAACA	1140
	L Y P S S R C T S K F L F N K T V T N N	
1141	ACATGCTGTGTGCTGGAGACACGCGGAGCGGAGAGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCT	1200
	M L C A G D T R S G E I Y P N V H D A C	
1201	GCCAGGGTGA CTCAGGAGGCCCTTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTG	1260
	Q G D S G G P L V C M N D N H M T L L G	
1261	GCATCATCAGTTGGGGTGTGGCTGTGGGGAGAAAAGACATTCCAGC. ATATACACCAAGG	1320
	I I S W G V G C G E K D I P G V Y T K V	
1321	TTACTAATTACCTAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCGCCCATAACCAAGAACACGCAACT	1380
	T N Y L G W I R D N M R P	
1381	CCCTGGCAGCCCCCTGCCTTCCTCCACCCCAAGAAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGAC	1440
1441	ACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCACACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGG	1500
1501	AAAGGGTGTACTTCCACAGGTACTTCCCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGAT	1560
1561	TTAGAATCCATTTCTGTCTAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCAGAACACCA	1620
1621	CCATCTAGGGCAGACAAGAGGTAGAATAAAAGCCCAACCTCCTAATCTGTCAACGTGAGC	1680
1681	AGCTTTGGAAATGGGACCACCAAGATGAAAGTATCTTTCTAGTAAAAAATAGCTAGATCC	1740
1741	TTAGTAAGAAGTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACACCCA	1800
1801	ACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGCGTTCCTCAGGC	1860
1861	CATCCTTTAAGTATTTGACTACCCCTTTCTACAGCTTTTGGGAAGGAATTCCTTTGTGT	1920
1921	ACAGTATAAATCTTTTTCCTTTATAAACTTTATAGTAGAAGAACTGTATCATCTGATAA	1980
1981	CTGCTAAACTAGGCTTTAGCATTTTGATATCAATCCATTGTAGTTGCCACAACCTCTGTAT	2040
2041	TATACTACACTGGAAAAATAAATTCAGGCATATTTTTCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2100

Фиг. 26d (продолжение)

```

1  GGCGCTGAAGCCCTGCAAGAGCTGAGCTGACGGGAAATCCTCTCCAGGAG 50
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  .....ACAGGGCTGGAGAGAAAACCTCTGC..GAG 28

51  AGAAGGAAGGCAAGGAGTGGCGAGTTTAAGGGACAC..CGCAGAAATGGT 98
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
29  GAAAGGGAAGGAGCAAGCCGTGAATTTAAGGGACGCTGTGAAGCAATCAT 78

99  GAATACAATGAAGACAAAGCTGTTGTGTGTACTGCTGCTTTGTGGAGCAG 148
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
79  GGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAG 128

149 TCTTCTCGTTGCCAGGCAGGAAACCTACAGGCAATTGGCAAGGGGATCC 198
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
129 TCTTCGTTTCGCCCAGCCAGGAAATCCATGCCCGATTGAGAAGAGGAGCC 178

199 AGAGCATATGGTGTGGCCTGCAAAGACGAAATAACCCAGATGACATACCG 248
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
179 AGATCTTACCAAGTGATCTGCAGAGATGAAAAACGCAGATGATATACCA 228

249 GCGACAAGAGTCGTGGCTGCGCCCCGAGGTCAGAAGCAAGCGGGTGGAAAC 298
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
229 GCAACATCAGTCATGGCTGCGCCCTGTGCTCAGAAGCAACCGGGTGGAAAT 278

299 ACTGCCAGTGCGATAGAGGCCAGGCCCGGTGCCACACCGTGCCCGTCAAC 348
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
279 ATTGCTGGTGCAACAGTGGCAGGGCACAGTGCCACTCAGTGCCTGTCAAA 328

349 AGTTGCAGTGAACCAAGGTGCTTCAATGGGGGACATGCTGGCAGGCTGT 398
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
329 AGTTGCAGCGAGCCAAGGTGTTTCAACGGGGGCACCTGCCAGCAGGCCCT 378

399 ATATTTCTCAGACTTTGTCTGTGTCAGTGCCCTGCAGGATATACGGGGAAAC 448
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
379 GTACTTCTCAGATTTCTGTGTGCCAGTGCCCCGAAGGATTTGCTGGGAAGT 428

449 GGTGTGAAGTAGATACCCGTGCCACCTGCTATGAGGGCCAGGGTGTCAAC 498
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
429 GCTGTGAAATAGATACCAGGGCCACGTGCTACGAGGACCAGGGCATCAGC 478

499 TACAGGGGCACATGGAGCACAGCAGAAAGTAGGGTTGAGTGTATCAACTG 548
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
479 TACAGGGGCACGTGGAGCACAGCGGAGAGTGGCGCCGAGTGACCAACTG 528

549 GAACAGCAGCCTTCTGACCCGGAGGACCTACAATGGGCGGATGCCAGATG 598
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
529 GAACAGCAGCGCGTTGGCCCAGAAGCCCTACAGCGGGCGGAGGCCAGACG 578

599 CCTTCAACCTGGGCCTTGGGAATCACAATTACTGCAGAAACCCAAATGGA 648
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
579 CCATCAGGCTGGGCCTGGGGAACCACAATACTGCAGAAACCCAGATCGA 628

649 GCCCCAAAACCTTGGTGCTATGTCATCAAGGCAGGGAAGTTCACCTCGGA 698
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
629 GACTCAAAGCCCTGGTGCTACGTCTTTAAGGCGGGGAAGTACAGCTCAGA 678

699 GTCCTGTAGCGTGCCGTGTCTGCTCCAAGGCCACCTGTG..... 736
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
679 GTTCTGCAGCACCCCTGCCTGCTCTGAGGGAAACAGTG..... 716

```

Фиг. 27


```

.....
717 ACTGCTACTTTGGAATGGGTCAGCCTACCGTGGCACGCACAGCCTCACC 766
.....
767 GAGTCGGGTGCCTCCTGCCTCCCGTGAATTCCATGATCCTGATAGGCAA 816
.....
817 GGTTTACACAGCACAGAACCCCACTGCCAGGCACTGGGCCTGGGCAAAC 866
.....
867 ATAATTACTGCCGGAATCCTGATGGGGATGCCAAGCCCTGGTGCCACGTG 916
.....
917 CTGAAGAACCGCAGGCTGACGTGGGAGTACTGTGATGTGCCCTCCTGCTC 966
.....
967 CACCTGCG..... 974

737 GCCTGAGAAAGTACAAGGAGCCACAGCTTCACAGTACAGGAGGACTCTTC 786
    |||||
975 GCCTGAGACAGTACAGCCAGCCTCAGTTTCGCATCAAAGGAGGGCTCTTC 1024
    |||||

787 ACAGACATCACCTCTCATCCATGGCAGGCTGCCATCTTTGCCCAGAACAG 836
    |||||
1025 GCCGACATCGCTCCACCCCTGGCAGGCTGCCATCTTTGCCAAGCACAG 1074
    |||||

837 AAGGTCATCAGGAGAAAGGTTCTTGTGTGGGGGGATATTGATCAGTTCCT 886
    |||||
1075 GAGGTCGCCCCGAGAGCGGTTCTGTGCGGGGCATACTCATCAGCTCCT 1124
    |||||

887 GCTGGGTCCTGACTGCTGCCCACTGCTTCCAGGAGAGCTATCTTCCTGAC 936
    |||||
1125 GCTGGATTCTCTCTGCCGCCCACTGCTTCCAGGAGAGGTTTCCGCCCCAC 1174
    |||||

937 CAGCTTAAGGTGGTTTTTGGGCAGAACATACCGGGTGAAACCTGGAGAGGA 986
    |||||
1175 CACCTGACGGTGATCTTGGGCAGAACATACCGGGTGGTCCCTGGCGAGGA 1224
    |||||

987 AGAGCAGACATTTAAAGTCAAAAAATACATCGTCCATAAGGAATTTGATG 1036
    |||||
1225 GGAGCAGAAATTTGAAGTCGAAAAATACATTGTCCATAAGGAATTCGATG 1274
    |||||

1037 ACGACACTTACAACAATGACATTGCACTGCTGCAGCTGAAATCGGACTCA 1086
    |||||
1275 ATGACACTTACGACAATGACATTGCGCTGCTGCAGCTGAAATCGGATTCTG 1324
    |||||

1087 CCACAGTGTGCCCAAGAGAGTGACAGTGTCCGCGCCATCTGTCTCCCGGA 1136
    |||||
1325 TCCCGCTGTGCCCAAGGAGAGCAGCGTGGTCCGCACTGTGTGCCTTCCCCC 1374
    |||||

1137 AGCCAACCTGCAGCTGCCCCGACTGGACAGAATGTGAGCTGTCTGGCTACG 1186
    |||||
1375 GGCGGACCTGCAGCTGCCCGACTGGACGGAGTGTGAGCTCTCCGGCTACG 1424
    |||||

1187 GCAAGCATAAGTCATCTTCTCCTTTCTATTCTGAGCAGCTGAAGGAAGGG 1236
    |||||
1425 GCAAGCATGAGGCCTTGTCTCCTTTCTATTCTGGAGCGGCTGAAGGAGGCT 1474
    |||||

```

Фиг. 27 (продолжение)

1237 CATGTCAGGCTGTACCCCTCCAGCCGCTGCGCACCCAAGTTTCTGTTTAA 1286
1475 CATGTCAGACTGTACCCATCCAGCCGCTGCACATCACAACATTTACTTAA 1524
1287 CAAAACCGTCACAAACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACGCGGAGCGGAG 1336
1525 CAGAACAGTCACCGACAACATGCTGTGTGCTGGAGACACTCGGAGCGGCG 1574
1337 AGATCTATCCAAATGTGCACGATGCCTGCCAGGGTGACTCAGGAGGCCCC 1386
1575 GGCCCCAGGCAAACCTGCACGACGCCTGCCAGGGCGATTTCGGGAGGCCCC 1624
1387 TTGGTGTGTATGAATGACAACCACATGACTTTGCTTGGCATCATCAGTTG 1436
1625 CTGGTGTGTCTGAACGATGGCCGCATGACTTTGGTGGGCATCATCAGCTG 1674
1437 GGGTGTGGCTGTGGGGAGAAAGACGTTCCAGGTGTATACACCAAGGTTA 1486
1675 GGGCCTGGGCTGTGGACAGAAGGATGTCCCGGGTGTGTACACCAAGGTTA 1724
37 CTAATTACCTAGGCTGGATTTCGAGACAACATGCACCTGTAACCAAGAACA 1536
1725 CCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGACCGTGACCAGGAACA 1774
1537 CACAACTCCCTGGCAGC.....CCCTGCCTTCCTCCAGCCCAGAAG 1577
1775 CCCGACTCCTCAAAAGCAAATGAGATCCCGCCTCTTCTTCTCAGAAGAC 1824
1578 AAACACAAGGCAGAATGCTTCCTGACACCAGTTTCTCCACAAGCCTGCAC 1627
1825 ACTGCAAAGGCGCAGTGCTTCTCTACAGACTTCTCCAGAC...CCACCAC 1871
1628 ACAGTACTAGTGGGGGGAGAACGTATAGGAGAGGGGAGAGGGTATACTTC 1677
1872 ACCGCAGAAGCGGGACGAGACCCTACAGGAGAGGGAAGAGTGCAT...TTT 1919
1678 CACAGGTACTTCCCACTTCATAAGTTTTTCAGGGGATAAGGTCTGATTTAG 1727
1920 CCCAGATACTTCCCATTTTGGAAAGTTTTCA..GGACTTGGTCTGATTTCA 1967
1728 AATCCATTTCTGTCAGACAAGAAGACAGATAAATGCCAACCCCTCCAGA 1777
1968 GGATACTCTGTCAGATGGGAAGACATGAATGCACACTAGCCTCTCCAGGA 2017
1778 ACACCACCATCTAGGGCAG.....ACAAGAGGTAGAATAAAA 1814
2018 ATGCCTCCTCCCTGGGCAGAAGTGGCCATGCCACCCTGTTTTCAGCTAAA 2067
1815 GCCCAACCTCCTAATCTGTCAACATGAGCAGCTTTGGAAATGGGACCACC 1864
2068 GCCCAACCTCCTGACCTGTCACCGTGAGCAGCTTTGGAAACAGGACCACA 2117
1865 AAGATGAAAGTATCTTTC..TAGTAAAAAATAGCTAGATCCTTCAGTAAA 1912
2118 AAAATGAAAGCATGTCTCAATAGTAAAAGATAACAAGATCTTTCAGGAAA 2167
1913 GAAGTATCACATTAGAAATAAAATGTCCATGTATAGTCACAAGGACGCC 1962
2168 GACGGATTGCATTAGAAATAGACAGTATATTTATAGTCACAAGAGCCCAG 2217
1963 AACAGCGACCTGGGCCTCCTAACAAGGAATGGGCTGTCTGGCCAGATTGC 2012
2218 CAGGCC.....TCAAAGTTGGGGCAGGCTGGCTGGCCCGTCATG 2256

Фиг. 27 (продолжение)

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
