



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75565** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 48/00
A61P 9/10 (2006.01)
C12N 9/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА СПОЛУКА ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ (ВАРІАНТИ), ФАРМАЦЕВТИЧНА СПОЛУКА ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ (ВАРІАНТИ) ТА СПОСІБ МОДУЛЮВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ З ЇХ ВИКОРИСТАННЯМ

1

(21) 2000127086
(22) 28.05.1999
(24) 15.05.2006
(86) PCT/US99/11780, 28.05.1999
(31) 60/087,220
(32) 29.05.1998
(33) US
(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.
(72) Череш Дейвід Е., US, Елісейрі Браєн , US, Шварцберг Памела Л., US
(73) ЗЕ СКРІПС РІСЬОРЧ ІНСТІТУТ, US, ЗЕ ГА-ВЕРНМЕНТ ОВ ЗЕ ЮНАЙТІД СТЕЙТС ОВ АМЕРІКА, US
(56) US A 5264618, 23.11.1993.
Koe gl et.al. Generation of a temperature-sensitive cSRC. Virology. 1993, Vol. 196, pages 369-371.
Kaplan et al. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. EMBO J. 1994, Vol. 13, pages 4745-4756.
Mukhopadhyay et al. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. Nature. June 1995, Vol. 375, pages 577-581.
Mukhopadhyay et al. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. Cancer research. 15 December 1995, Vol. 55, pages 6161-6165.
Hirai et al. SH2 mutants of c-Src that are host dependent for transformation are trans-dominant inhibitors of mouse cell transformation by activated c-Src. Genes and Development. December 1990, Vol. 4, No. 12B, pages 2342-2352.
(57) 1. Фармацевтична сполука для стимулювання ангіогенезу у тканині-мішені ссавців, яка містить терапевтичну кількість вірусного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично припустимий носій або наповнювач; причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує Src-білок (тирозинкіназу), а вищевказаний Src-білок має будь-який

2

амінокислотний залишок у кодоні 527, за винятком тирозину, серину або треоніну.
2. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 1, у якій вищевказаний Src-білок є активним Src-білком.
3. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 2, у якій вищевказаний активний Src-білок є Src A.
4. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 1, яка характеризується тим, що додатково містить ліпосому.
5. Фармацевтична сполука для стимулювання ангіогенезу у тканині-мішені ссавців, яка містить терапевтичну кількість невірусного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично припустимий носій або наповнювач; причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує Src-білок, а вищевказаний Src-білок має будь-який амінокислотний залишок у кодоні 527, за винятком тирозину, серину або треоніну.
6. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 5, у якій вищевказаний Src-білок є активним Src-білком.
7. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 6, у якій вищевказаний активний Src-білок є Src A.
8. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 5, яка характеризується тим, що додатково містить ліпосому.
9. Фармацевтична сполука для інгібування ангіогенезу у тканині-мішені ссавців, яка містить терапевтичну кількість вірусного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично припустимий носій або наповнювач; причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує Src-білок, у якому відсутня кіназна активність.
10. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 9, яка характеризується тим, що вищевказаний Src-білок є неактивним Src-білком.
11. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 10, у якій вищевказаний неактивний Src-білок є Src 251 або Src K295M.

(13) **C2**
(11) **75565**
(19) **UA**

12. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 9, яка характеризується тим, що додатково містить ліпосому.
13. Фармацевтична сполука для інгібування ангіогенезу у тканині-мішені ссавців, яка містить терапевтичну кількість невірусного вектора експресії, що містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично припустимий носій або наповнювач; причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує Src-білок, у якому відсутня кіназна активність.
14. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 13, яка характеризується тим, що вищевказаний Src-білок є неактивним Src-білком.
15. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 14, у якій вищевказаний неактивний Src-білок є Src 251 або Src K295M.
16. Фармацевтична сполука згідно з пунктом 13, яка характеризується тим, що додатково містить ліпосому.
17. Спосіб модулювання ангіогенезу у тканині, пов'язаний із станом захворювання, який включає застосування до цієї тканини фармацевтичної сполуки, що містить терапевтичну кількість вектора експресії, який містить нуклеїнову кислоту, яка кодує Src-білок.
18. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказаний вектор експресії є ретровірусним вектором експресії.
19. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказаний вектор експресії є невірусним вектором експресії.
20. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказана фармацевтична сполука додатково містить ліпосому.
21. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказане застосування включає застосування внутрішньовенним, кризьшкірним, внутрішньочеревним, внутрішньом'язовим або пероральним шляхом.
22. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказа-

- не застосування включає внутрішньовенне введення разової дози.
23. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказаний Src-білок є активним Src-білком, і вищевказане модулювання є стимулюванням ангіогенезу.
24. Спосіб згідно з пунктом 23, у якому вищевказаний активний Src-білок є Src A.
25. Спосіб згідно з пунктом 23, у якому вищевказана тканина має поганий кровообіг.
26. Спосіб згідно з пунктом 17, у якому вищевказаний Src-білок є неактивним Src-білком, і вищевказане модулювання є інгібуванням ангіогенезу.
27. Спосіб згідно з пунктом 26, у якому вищевказаний неактивний Src-білок є Src 251 або Src K295M.
28. Спосіб згідно з пунктом 26, у якому вищевказана тканина знаходиться в стані запалення, і вищевказаний стан захворювання є артритом або ревматичним артритом.
29. Спосіб згідно з пунктом 26, у якому вищевказана тканина є солідною пухлиною або метастазами солідної пухлини.
30. Спосіб згідно з пунктом 29, у якому вищевказане застосування здійснюють разом з хіміотерапією.
31. Спосіб згідно з пунктом 26, у якому вищевказана тканина є ретинальною тканиною, і вищевказаний стан захворювання є ретинопатією, діабетичною ретинопатією або дистрофією жовтої плями сітківки.
32. Спосіб згідно з пунктом 26, у якому вищевказана тканина знаходиться у місці коронарної пластичної операції на судинах, і вищевказана тканина знаходиться під ризиком виникнення рестенозу.
33. Лікарський засіб для модулювання ангіогенезу у тканині-мішені ссавців, який містить фармацевтичну сполуку згідно з пунктами 1-16, розміщену в упаковці з етикеткою, на якій вказано, що ця фармацевтична сполука може бути застосована для лікування станів захворювання шляхом модулювання ангіогенезу.

У цій заявці заявлений ефект винаходу, описаного у попередній заявці [на патент США з серійним номером 60/087,220, поданий 29 травня 1998р.], яка включена до опису винаходу шляхом посилання, як і всі інші посилання, що згадуються тут.

Цей винахід в основному стосується галузі медицини і зокрема способів та сполук для модулювання ангіогенезу тканин з використанням протеїну тирозинкінази Src, різновидів Src та нуклеїнових кислот, що їх кодують.

Ангіогенез (розвиток кровоносних судин – прим. перекладача) є процесом васкуляризації тканин, пов'язаним з вrostанням новоутворених кровоносних судин у тканину, який також іноді називають неоваскуляризацією. Цей процес викликається інфільтрацією ендотеліальних клітин і клітин гладких м'язів. Вважається, що цей процес відбувається одним з трьох шляхів: судини можуть відростати від судин, які існували раніше, розвиток нових судин може виникати від клітин-

попередників (васкулогенез), або існуючі невеличкі судини можуть збільшуватися в діаметрі [Blood et al., Bioch. Biophys Acta, 1032:89-118(1990)].

Ангіогенез є важливим процесом при зростанні новонароджених, але він є важливим також при загоєнні ран і при патогенезі величезної кількості клінічних захворювань, включаючи запалення тканин, артрит, зростання пухлин, діабетичну ретинопатію, переродження плям на роговиці при неоваскуляризації сітківки і подібні стани. Ці клінічні прояви, пов'язані з ангіогенезом, одержали назву ангіогенних захворювань [Folkman et al., Science, 235:442-447 (1987)]. Ангіогенезу звичайно немає в дорослих або зрілих тканинах, хоча він все-таки відбувається при загоєнні ран та у циклі зростання жовтого тіла. [Див, наприклад, Moses et al., Science, 248:1408-1410 (1990)].

Було припущено, що інгібування ангіогенезу може виявитися корисною терапією для обмеження зростання пухлин. Було запропоновано здійснювати інгібування ангіогенезу шляхом: (1) інгібу-

вання звільнення "ангіогенних молекул", наприклад, таких, як оФРФ (основний фактор росту фібробластів), (2) нейтралізації ангіогенних молекул, наприклад, шляхом використання анти- β -оФРФ антитіл, (3) використання інгібіторів рецептора вітронектину $\alpha_v\beta_3$, та (4) інгібування реакції ендотеліальних клітин на ангіогенні стимули. Цей останній підхід привернув увагу, і [Folkman et al., *Cancer Biology*. 3:89-96 (1992)] описали кілька інгібіторів реакції ендотеліальних клітин, включаючи інгібітор колагенази, інгібітори відновлення базальної мембрани, ангіостатичні стероїди, отримані з грибків інгібітори ангіогенезу, тромбоцитарний фактор 4, тромбоспондин, ліки від артриту, наприклад, такі, як D-пеніциламін та тіомалат золота, аналоги вітаміну D3, альфа-інтерферон та інші, які можуть бути використані для інгібування ангіогенезу. Про додаткові запропоновані інгібітори ангіогенезу [див. Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta*, 1032:89-118 (1990); Moses et al., *Science*, 248:1408-1410 (1990); Ingber et al., *Lab Invest.* 89:44-51 (1988) та патенти США №№5 092 885, 5 112 946, 5 192 744, 5 202 352, 5 753 230 та 5 766 591]. Жодний з інгібіторів ангіогенезу, описаних у попередніх повідомленнях, не пов'язаний з Src-білками.

Щоб відбувся ангіогенез, ендотеліальні клітини повинні спочатку деградувати та взаємодіяти з базальною мембраною кровоносних судин подібно тому, як це роблять клітини пухлин під час інвазії та утворення метастаз.

Раніше винахідники повідомляли про те, що ангіогенез залежить від взаємодії між васкулярними інтегринами та білками позаклітинного матриксу [Brooks et al., *Science*, 264:569-571 (1994)]. Крім того, повідомлялося про те, що запрограмована смерть (апоптоз) ангіогенних васкулярних клітин викликається взаємодією, яка може бути інгібована певними антагоністами васкулярного інтегрину $\alpha_v\beta_3$ [Brooks et al., *Cell*, 79 1157-1164 (1994)]. Зовсім нещодавно винахідники повідомили про те, що зчеплення металопротеїнази-2 матриксу (МПМ-2) з рецептором вітронектину ($\alpha_v\beta_3$) може бути інгібоване шляхом використання антагоністів $\alpha_v\beta_3$, що, отже, інгібує ферментативну функцію протеїнази [Brooks et al., *Cell*, 85:683-693 (1996)].

Цей винахід спрямований на модулювання ангіогенезу у тканинах за допомогою тирозинкінази Src, яка тут у загальному вигляді називається Src.

Розглядаються сполуки та способи модулювання ангіогенезу в тканині, пов'язаний з яким-небудь захворюванням. Тканину, яку необхідно вилікувати від захворювання, обробляють сполукою, що містить кількість Src-білка, достатню для модулювання ангіогенезу. Сполука, що містить Src-білок, може містити очищений білок, біологічно активні білкові фрагменти, отриманий рекомбінуванням Src-білок або фрагменти білків або злиті з них білки, або вектори експресії генів/нуклеїнової кислоти для експресії Src-білків.

Коли Src-білок інактивується або пригнічується, модулювання являє собою інгібування ангіогенезу. Коли Src-білок є активним або активується, модулювання являє собою посилення ангіогенезу.

Тканина, яку буде піддано лікуванню, може бути будь-якою тканиною, для якої є бажаним модулювання ангіогенезу. Інгібування ангіогенезу є

корисним при лікуванні ураженої тканини там, де відбувається шкідлива неоваскуляризація. Прикладові тканини включають запалені тканини, тверді пухлини, метастази, тканини, у яких відбувається рестеноз, і подібні їм тканини.

Посилення є корисним при лікуванні пацієнтів з ішемічними кінцівками, у яких спостерігається погана циркуляція у кінцівках, викликана діабетичними або іншими станами. Пацієнти з хронічними ранами, що не загоюються і для яких, отже, можуть виявитися корисними збільшення проліферації клітин судин та неоваскуляризація, можуть також бути вилікувані.

Найкращим є використання Src-білка, що містить модифікований ланцюжок амінокислоти, який описується тут. Тут описані кілька особливо корисних модифікованих Src-білків та їхня експресія.

Таким чином, у цьому винаході розглядається фармацевтична сполука для стимулювання ангіогенезу в тканині-мішені ссавців, яка містить вірусний або невірусний вектор переносу генів, який містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично придатний носій або наповнювач, причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує Src-білок, а вищевказаний Src-білок має залишок будь-якої амінокислоти в кодоні 527, за винятком тирозину, серину або треоніну.

Також описується фармацевтичний препарат для інгібування ангіогенезу в тканині-мішені ссавців, який містить вірусний або невірусний вектор переносу генів, що містить нуклеїнову кислоту та фармацевтично придатний носій або наповнювач, причому вищевказана нуклеїнова кислота має сегмент нуклеїнової кислоти, який кодує білок Sic, у якому відсутня активність кінази.

На кресленнях, які складають частину цього опису:

Фіг.1 є послідовністю кДНК C-Src курчати, яка є повною кодованою послідовністю з видаленими інтронами, що вперше було описано [Takeya et al., *Cell*, 32:881-890 (1983)]. Цю послідовність можна знайти під інвентарним номером J00844 генного банку. Послідовність містить 1759 нуклеотидів, а кодуюча частина білка починається та закінчується відповідно в положеннях нуклеотидів 112 та 1713.

Фіг.2 є кодованою послідовністю залишку амінокислоти c-Src курчати кодуючої послідовності, показаної на Фіг.1.

Фіг.3 є послідовністю кДНК c-Src людини, вперше описаною [Braeuninger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:10411-10415 (1991)]. Цю послідовність можна знайти під інвентарним номером X59932 X71157 генного банку. Послідовність містить 2187 нуклеотидів, а кодуюча частина білка починається та закінчується відповідно в положеннях нуклеотидів 134 та 1486.

Фіг.4 є кодованою послідовністю залишку амінокислоти c-Src людини кодуючої послідовності, показаної на Фіг.3.

На Фіг.5 показана активація ендогенного Src за допомогою оФРФ або ФРСЕ (фактору росту судинного ендотелію - прим. перекладача), описана в прикладі 4. У верхній частині фігури показані результати аналізу кінази *in vitro* із згорнутою ак-

тивацією ендogenous c-Src за допомогою оФРФ або ФРСЕ. У нижній частині фігури приведений відбиток аналізу кінази, досліджуваний за допомогою анти-Src антитіла як контролю навантаження для еквівалентного вмісту Src та імуноглобуліну.

На Фіг.6 показаний вплив ретровірусної генної експресії c-Src A на ангіогенез у хоріоналантоїсній мембрані (ХАМ) курчати, описаний у прикладі 4. ХАМ дев'ятидобових курчат піддавали впливу ЗРВСП-Src A (активно мутованого c-Src) (ЗРВСП - здатний до реплікації вірус саркоми птахів, прим, перекладача), або контрольних ретровірусів ЗРВСП-ЗФБ (ЗФБ - зелений флуоресцентний білок; флуоресцентний білок-індикатор), або буфера протягом 72г. Рівень ангіогенезу був визначений так, як це показано на Фіг.6А, причому репрезентативні мікрофотографії (з чотириразовим збільшенням) на Фіг.6В, які відповідають кожному етапу лікування, були зроблені за допомогою стереомікроскопа.

На Фіг.7 показана ретровірусна експресія c-Src A при активації фосфорилювання васкулярної активованої мітогеном протеїнкінази (АМП кінази).

На Фіг.7А показані екстракти тканин ХАМ 10-денних курчат, які піддавали впливу ФРСЕ або ФМА (форболмірістатацетату) протягом 30 хвилин або інфікували ретровірусом C-Src A протягом 48 годин. ВЛ означає відсутність лікування. Імунопреципітат Src утворили з еквівалентних кількостей загального екстракту протеїну та піддали імунокомплексному аналізу кіназної активності *in vitro* з використанням злитого білка КФА-Г-S-T (де КФА - кіназа з фокальною адгезією, а Г-S-T - глутатіон-5-трансфераза, прим, перекладача) як субстрат, піддавали електрофорезу та переносили до нітроцелюлози. Аліквоти вищевказаних лізатів цілих тканин також вимірювали на ендogenous фосфорилювання ПРСК (позаклітинної регульованої сигналом кінази) за допомогою імуноблотингу з анти-фосфо-ПРСК антитілом.

На Фіг.7В показані 10-денні ХАМ, які були інфіковані контрольними ЗРВСП або ЗРВСП, що містили Src A. Через два дні ХАМ препарували, зберігали при криогенній температурі у криоконсерванті ОСТ та розділяли на частини по 4мм. Частини офарбили з використанням імуноної мітки анти-фосфорилюваним антитілом ПРСК ("Нью Інгліш Байолабз"), промили та визначили за допомогою протикротячого кон'югованого з ФІТЦ (ФІТЦ - флуоресцеїн ізотіоціанат, прим, перекладача) вторинного антитіла цапа. Флуоресцентні образи були зафіксовані камерою на охолоджуваних приладах із зарядовим зв'язком ("Принстон Інст.").

На Фіг.8 показані вибіркові вимоги до активності Src під час ангіогенезу, викликаного ФРСЕ, але не оФРФ. ХАМ дев'ятиденних курчат піддавали впливу ЗРВСП-Src 251 або контрольних ЗРВСП-ЗФБ ретровірусів, або буфера протягом 20 годин, а потім інкубували протягом ще 72 годин при оФРФ або ФРСЕ або у їх відсутності. Рівень ангіогенезу вимірювали на Фіг.8А, як це було описано вище, та стереомікроскопом були зроблені репрезентативні мікрофотографії (з шестиразовим збільшенням), як показано на Фіг.8В.

На Фіг.8С показана пляма, зондована Анти-Src антитілом для підтвердження експресії Src 251 у

трансфікованих клітинах у порівнянні з контрольною обробкою.

На Фіг.9 показані результати ретровірусної доставки ЗРВСП-Src 251 до пухлини людини. Фіг.9А є мікрофотографією, на якому показаний фрагмент медулобластомної пухлини людини, інфікований ЗРВСП-ЗФБ (ЗФБ - зелений флуоресцентний протеїн). експресія ЗФБ у якій відбувається виключно в кровоносних судинах пухлини (розмірна стрілка), як було виявлено при оптичному розсіненні за допомогою співфокусного лазерного сканувального мікроскопа "Bio Rad" (смуга =500мкм). На Фіг.9В зображені дані досліджень пухлини, оброблених шляхом місцевої аплікації ретровірусу, яким було дозволено зростати протягом від 3 до 6 днів, після чого вони були резектовані, і була визначена їхня волога вага. Дані подані як середня зміна ваги пухлин (від початкової ваги пухлини 50 міліграмів) +/- СЗП з 2 реплікацій.

На Фіг.9С зображений репрезентативний мікрофотограф медулобластомних пухлин, вилучених з ембріонів хірургічним шляхом (смуга =350мкм). Нижні панелі є сильно збільшеними видами кожної пухлини, що детально показують судинну мережу кожної пухлини (смуга =350мкм). Розмірна стрілка вказує на руйнацію кровоносних судин у пухлинах, оброблених ЗРВСП-Src 251.

Фіг.10 є діаграмою, що ілюструє карту векторної обмежувальної конструкції ЗРВСП-ВР (ЗРВСП).

А. Визначення

Амінокислотний залишок: Амінокислота, утворена при хімічному перетравленні (гідролізі) поліпептиду по його пептидних зв'язках. Амінокислотні залишки, що описуються тут, знаходяться переважно в ізомерній формі L. Проте залишки в ізомерній формі D можуть бути замінені будь-якими L-амінокислотними залишками, якщо пептидом зберігається бажана функціональна властивість. NH₂ позначає вільну аміногрупу, яка присутня на амінокінці поліпептиду. COOH позначає вільну карбоксильну групу, яка присутня на карбокси-кінці поліпептиду згідно зі стандартною номенклатурою поліпептиду [що описано в J.Biol.Chem., 243:3552-59 (1969) та прийнято в 37 Кодексі федеральних нормативних актів, §1. 822(b)(2)].

Слід зазначити, що всі послідовності амінокислотних осадів представлені тут формулами, ліві та праві орієнтації яких знаходяться в умовному напрямку від аміно-кінця до карбокси-кінця. Крім того, слід зазначити, що тире на початку або кінці послідовності амінокислотних осадів вказує на пептидний зв'язок з наступною послідовністю одного або більш амінокислотних осадів.

Поліпептид: позначає лінійну групу амінокислотних осадів, пов'язаних один з одним пептидними зв'язками між альфа-аміногрупами та карбоксигрупами суміжних амінокислотних осадів.

Пептид: у його використанні в цьому описі позначає лінійну групу з не більш ніж 50 амінокислотними осадими, пов'язаними один з одним, як у поліпептиді.

Циклічний пептид: позначає сполуку, яка має кільцеву структуру, що включає кілька амідних зв'язків, як у типовому пептиді. Циклічний пептид може являти собою гомодетичний циклічний пеп-

тид, сполучений "головою до хвоста", або може містити гетеродетичну кільцеву структуру, у якій кільце замикається дисульфідними мостами. лактамними мостами, тіоефірами, тіоамідами, гуанідинами і подібними зв'язками.

Білок: позначає лінійну групу з більш ніж 50 амінокислотними осадами, пов'язаними один з одним, як у поліпептиді.

Злитий білок: позначає поліпептид, який містить принаймні два різних поліпептидних домени, оперативного сполучених типовим пептидним зв'язком ("злитих"). причому ці два домени відповідають пептидам, які в природі в злитій формі не зустрічаються.

Синтетичний пептид: позначає отриманий хімічним способом ланцюг амінокислотних осадів, пов'язаний пептидними зв'язками, який внаслідок цього вільний від білків, які зустрічаються в природі, та їхніх фрагментів.

B. Загальний аналіз

Цей винахід в основному стосується відкриття того, що ангіогенез опосередкованим чином викликається протеїном тирозинкіназою Src, і що ангіогенез можна модулювати шляхом забезпечення активних або неактивних білків Src для посилення або пригнічення ангіогенезу, відповідно.

Це відкриття є важливим внаслідок тієї ролі, яку ангіогенез, або утворення нових кровоносних судин, грає в різноманітних процесах захворювань. Якщо тканини, пов'язані зі станом хвороби, потребують ангіогенезу для свого зростання, то бажано інгібувати ангіогенез і, таким чином, інгібувати зростання уражених тканин. Якщо uszkodжена тканина потребує ангіогенезу для свого зростання та загоєння, то бажано посилювати ангіогенез або сприяти йому і, таким чином, сприяти загоєнню та зростанню тканини.

Якщо зростання нових кровоносних судин є причиною патології або сприяє патології, пов'язаній з ураженою тканиною, то інгібування ангіогенезу знижує шкідливий ефект захворювання. Шляхом інгібування ангіогенезу можна втручатися у хід захворювання, покращувати симптоми, а в деяких випадках і виліковувати захворювання.

Приклади тканин, пов'язаних з захворюванням та неоваскуляризацією, для яких буде корисним інгібування модулювання ангіогенезу, включають тканини, уражені ревматоїдним артритом, діабетичною ретинопатією, запальними захворюваннями, рестенозом і тому подібними захворюваннями. Якщо зростання нових кровоносних судин є потрібним для підтримання зростання шкідливої тканини, то інгібування ангіогенезу знизить кровопостачання в тканині і, таким чином, сприятиме зниженню маси тканини, яка залежить від кровопостачання. Приклади включають зростання пухлин у тих випадках, коли неоваскуляризація є постійною умовою зростання пухлини в товщину на декілька міліметрів та для утворення твердих метастаз пухлини.

Якщо зростання нових кровоносних судин сприяє загоєнню тканини, і о стимулювання ангіогенезу допомагає в лікуванні. Приклади включають лікування хворих з ішемічними кінцівками, у яких спостерігається погана циркуляція в кінцівках, викликана діабетами або іншими станами. Також

розглядається лікування хворих з хронічними ранами, які не загоюються і для яких, отже, може бути корисним підвищення проліферації клітин судин та неоваскуляризація.

Способи згідно з цим винаходом є частково ефективними, оскільки лікування високо вибірково для ангіогенезу, але не для інших біологічних процесів.

Як було описано вище, ангіогенез включає ряд процесів, пов'язаних з неоваскуляризацією у тканині, включаючи "пророщення", васкулогенез або збільшення судин, причому на всі ці процеси ангіогенезу впливає Src-білок. Вважається, що більшість процесів ангіогенезу пов'язані з процесами захворювань, за винятком лікування травматичних ран, утворення жовтого тіла та ембріогенезу, отже, ці терапевтичні методи є вибілковими щодо захворювання і не мають шкідливих побічних ефектів.

C. Src-білки

Білок тирозинкіназа Src, який використовується у цьому винаході, може бути різним в залежності від передбачуваного використання. Терміни "Src-білок" або "Sic" використовуються для позначення різноманітних форм білків тирозинкінази Src, що описуються тут, як в активній, так і в неактивній формі.

"Активний Src-білок" позначає будь-яку форму з ряду форм Src-білків, яка посилює ангіогенез. Тут описані дослідження з вимірювання посилення ангіогенезу, які не варто тлумачити як обмежувальні. Білок вважається активним, якщо рівень ангіогенезу більше принаймні на 10%, краще на 25%, і ще краще на 50%, ніж контрольний рівень, при якому в досліджувану систему не добавляли Src. Найкращим дослідженням для вимірювання посилення є дослідження ХАМ з використанням вірусного вектора ЗРВСП, як це описано в Прикладах, у яких індекс ангіогенезу обчислюється шляхом підрахунку точок розгалуження. У кращому випадку активний Src-білок проявляє також тирозинкіназну активність. Зразкові активні Src-білки описані в Прикладах та включають Src-A.

"Неактивний Src-білок" позначає будь-яку форму з ряду форм Src-білків, яка інгібує ангіогенез. Тут описані дослідження з вимірювання інгібування ангіогенезу, які не варто тлумачити як обмежувальні. Білок вважається неактивним, якщо рівень ангіогенезу менше принаймні на 10%, краще на 25%, і ще краще на 50%, ніж контрольний рівень, при якому в досліджувану систему не добавляли екзогенний Src. Найкращим дослідженням для вимірювання інгібування є дослідження ХАМ з використанням вірусного вектора ЗРВСП, як це описано в Прикладах, у яких індекс ангіогенезу обчислюється шляхом підрахунку точок розгалуження. У кращому випадку неактивний Src-білок проявляє також знижену тирозинкіназну активність. Зразкові неактивні Src-білки описані в Прикладах та включають Src-251.

Src-білок, який є корисним для цього винаходу, може бути отриманий будь-яким з ряду способів, включаючи виділення з природних джерел, включаючи тканини, одержання шляхом експресії рекомбінантної ДНК та очищення тощо. Src-білок можна також одержати *in situ* шляхом введення системи генної терапії до тканини, яка нас ціка-

вить, яка потім зробить експресію білка у тканині.

Ген, який кодує Src-білок, може бути виготовлений рядом способів, відомих у цій галузі техніки, і цей винахід не слід тлумачити як обмежувальний у цьому відношенні. Наприклад, широким відомим є те, що природна історія Src-білка містить ряд гомологів ссавців, птахів, вірусів та інших видів, і ген може легко бути клонований з використанням методу клонування кДНК з будь-якої тканини, що експресує білок. Найкращим білком Src для використання у винаході є клітинний білок, такий, як гомологи ссавців або птахів, позначені c-Src. Найкращим у деяких випадках є c-Src людини.

D. Молекули рекомбінантної ДНК та системи експресії для експресії Src-білка.

У винаході описано кілька особливо корисних для цього винаходу послідовностей нуклеотидів. Ці послідовності включають такі послідовності, які кодують Src-білок, корисний для цього винаходу, та різноманітні сегменти ДНК, молекули рекомбінантної ДНК (рДНК) та вектори, сконструйовані для експресії Src-білка.

Молекули (сегменти) ДНК згідно з цим винаходом, отже, можуть містити послідовності, які кодують цілі структурні гени, фрагменти структурних генів і одиниці транскрипції, як це тут буде описано далі.

Кращим сегментом ДНК є нуклеотидна послідовність, яка кодує Src-білок, як це було визначено тут, або його біологічно активний фрагмент.

Послідовність амінокислотних залишків та нуклеотидна послідовність найкращого білка c-Src описані в Прикладах.

Кращий сегмент ДНК кодує послідовність амінокислотних залишків, яка є значною мірою такою самою, як послідовність амінокислотних залишків або її частини, що відповідають описаному тут Src-білку, і переважно в основному складається з неї. Репрезентативні та найкращі сегменти ДНК далі описані в Прикладах.

Послідовність амінокислотних залишків білка або поліпептиду безпосередньо пов'язана через генетичний код з послідовністю дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) структурного гена, що кодує білок. Таким чином, структурний ген або сегмент ДНК може бути визначений на підставі послідовності амінокислотних залишків, тобто білка або поліпептиду, який він кодує.

Важливою і добре відомою особливістю генетичного коду є його надмірність. Тобто, для більшості амінокислот, що використовуються для утворення білків, більш, ніж один кодуючий нуклеотидний триплет (кодон) може кодувати конкретний амінокислотний залишок або позначати його. Отже, ряд різних нуклеотидних послідовностей може кодувати конкретну послідовність амінокислотних залишків. Такі нуклеотидні послідовності вважаються функціонально еквівалентними, оскільки вони можуть призводити до утворення однієї і тієї ж самої послідовності амінокислотних залишків у всіх організмах. Іноді до складу наданої нуклеотидної послідовності може входити метильований різновид пурину або піримідину. Проте такі метилування ніяк не впливають на відносини кодування.

Нуклеїновою кислотою є будь-який нуклеотид

або фрагмент нуклеїнової кислоти, незалежно від того, чи є він полірибонуклеотидом або полідезоксирибонуклеотидом, тобто РНК або ДНК, або їхніми аналогами. У найкращих варіантах реалізації цього винаходу молекула нуклеїнової кислоти знаходиться у формі сегмента дуплексної ДНК, тобто фрагменту ДНК, хоча в деяких методологіях молекулярної біології найкращими вважаються одноланцюгові ДНК або РНК.

Сегменти ДНК отримують рядом засобів, включаючи методи хімічного синтезу та рекомбінантні підходи, краще шляхом клонування або ланцюгової реакції полімерази (ЛРП). Фрагменти ДНК, які кодують частини Src-білка, легко можуть бути синтезовані хімічними засобами, наприклад, фосфотриєфірним методом [Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191, 1981], або з використанням автоматизованих методів синтезу. Крім того, великі сегменти ДНК можна легко приготувати за допомогою добре відомих методів, таких, як синтез групи олігонуклеотидів, що визначають сегмент ДНК, за яким слідує гібридизація та лігування олігонуклеотидів для побудовання повного сегмента. Альтернативні методи включають виділення кращого сегмента ДНК шляхом ЛРП пари олігонуклеотидних праймерів, використаних з бібліотеки кДНК, що, як вважається, містить члени, які кодують Src-білок.

Безсумнівно, за допомогою хімічного синтезу будь-які необхідні модифікації можуть бути отримані лише шляхом заміни відповідних основ на ті, які кодують нативну послідовність амінокислотних залишків. Цей метод добре відомий і може бути легко застосований для одержання різних інших "модифікованих" Src-білків, описаних тут.

Більш того, сегменти ДНК, які складаються головним чином з структурних генів, які кодують Src-білок, можуть бути згодом модифіковані, як при сайт-специфічному або випадковому мутагенезі, для впровадження будь-яких необхідних заміщень.

1. Клонування гена Src

Ген Src може бути клонований з придатного джерела геномної ДІЖ або матричної РНК (мРНК) різноманітними біохімічними методами. Клонування цих генів може бути здійснено згідно з загальними методами, описаними у Прикладах, і так, як відомо у цій галузі техніки.

Джерела нуклеїнових кислот для клонування гена Src, придатні для використання у способах згідно з цим винаходом, можуть містити геномну ДНК або матричну РНК (мРНК) у вигляді бібліотеки кДНК, з тканини, яка, як вважається, експресує ці білки. Найкращою тканиною є тканина легенів людини, хоча можна використовувати і будь-яку іншу придатну тканину.

Кращий метод клонування включає готування бібліотеки кДНК з використанням стандартних методів та виділення нуклеотидної послідовності, що кодує Src, шляхом посилення ЛРП з використанням пари олігонуклеотидних праймерів на підставі описаних тут нуклеотидних послідовностей. В іншому варіанті бажані клони кДНК можуть бути ідентифіковані та виділені з кДНК або геномної бібліотеки звичайними методами гібридизації нуклеїнової кислоти з використанням зонда гібридизації на підставі описаних тут послідовностей

нуклеїнової кислоти. Інші методи виділення та клонування придатних нуклеїнових кислот, які кодуєть Src, є достатньо очевидними для спеціалістів у цієї галузі техніки.

2. Вектори експресії

Молекула рекомбінантної ДНК (рДНК), яка містить сегмент ДНК, що кодує Src-білок, може бути отримана так, як описується тут. Зокрема, експресована рДНК може бути отримана шляхом оперативного (у рамці та експресивного) зчеплення вектора з сегментом ДНК, що кодує Src. Таким чином, молекула рекомбінантної ДНК є гібридною молекулою ДНК, що містить принаймні дві нуклеїнові кислоти з нуклеотидних послідовностей, які звичайно в природі разом не зустрічаються.

Вибір вектора, з яким оперативно зчіплюється сегмент ДНК, безпосередньо залежить, як відомо в цій галузі техніки, від бажаних функціональних властивостей, наприклад, експресії білків, та клітини-хазяїна, яку слід трансформувати. Вектор, який є придатним для використання при реалізації цього винаходу, є принаймні спроможним до спрямовування реплікації, а також краще до експресії структурного гена, включеного до сегментів ДНК вектору, з якими він оперативно зчіплюється.

Вектори як прокариотичної, так й еукаріотичної експресії знайомі будь-якому фахівцю з середнім рівнем знань у галузі векторних конструкцій і описані [Ausebel et al., в Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, Нью-Йорк (1993) і Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, "Колд Спрінг Хабор Лебореторі" ("Cold Spring Harbor Laboratory"), (1989)]. У цих посиланнях також описано багато загальних методів рекомбінантної ДНК, на які тут є посилання.

В одному з варіантів реалізації винаходу придатний вектор містить прокариотичний реплікон, тобто послідовність ДНК, яка має здатність спрямовувати автономну реплікацію і підтримання молекули рекомбінантної ДНК позахромосомно в прокариотичній клітині-хазяїні, такий, як бактеріальна клітина-хазяїн, трансформованій за її допомогою. Такі реплікони є добре відомими у цій галузі техніки. Крім того, ті варіанти реалізації винаходу, які включають прокариотичний реплікон, також включають і ген. експресія якого надає лікарську стійкість до бактеріального хазяїна, трансформованого за його допомогою. Типові бактеріальні гени лікарської стійкості - це ті, які дають стійкість до ампіциліну або тетрацикліну.

Ті вектори, що містять прокариотичний реплікон, можуть також містити прокариотичний промотор, спроможний спрямовувати експресію (транскрипцію і трансляцію) структурного гена в бактеріальній клітині-хазяїні, наприклад, такий, як *E. coli*, трансформованій за його допомогою. Промотор - це керуючий елемент експресії, утворений послідовністю ДНК, який дозволяє відбуватися зв'язуванню РНК полімерази і транскрипції. Послідовності промоторів, сумісні з бактеріальними хазяїнами, звичайно утворюються в плазмідних векторах, які містять зручні сайти рестрикції для вставки сегмента ДНК згідно з цим винаходом. Такими типовими плазмідними векторами є pUC86 pUC9, pBR322 та pBR329, які можна отримати в "Байорад Лебораторі" ("Bioiad Laboratories"), Річ-

монд, Каліфорнія, pRSET, який можна отримати в "Інвітроген" ("Invitrogen"), Сан-Дієго, Каліфорнія, а також pPL та pKK223, які можна отримати в "Фармасія" ("Pharmacia"), Піскатавей, Нью-Джерсі.

Вектори експресії, сумісні з еукаріотичними клітинами, краще - сумісні з хребетними клітинами, також можуть бути використані для утворення молекул рекомбінантної ДНК згідно з цим винаходом. Вектори експресії еукаріотичних клітин добре відомі у цій галузі техніки і можуть бути отримані з кількох промислових джерел. Звичайно такі вектори представляються з вмістом зручних сайтів рестрикції для вставки бажаного сегмента ДНК. Типовими такими векторами є pSVL та pKSV-10 ("Фармасія") ("Pharmacia"), pBPV-1/pML2d ("Інтернешнл Байотекнологіс, Інк.") (International Biotechnologies, Inc), pTDTI (Американська колекція типових культур, №31255). pRc/CMV ("Інвітроген, Інк.") (Invitrogen, Inc), кращий вектор, який описаний в Прикладах, і подібні еукаріотичні вектори експресії.

Найкраща система для експресії генів в контексті цього винаходу містить компонент доставки гена, тобто можливість доставки гена до тканини, яка нас цікавить. Придатними є "інфекційні" вектори, наприклад, такі, як віруси рекомбінантної ДНК, вектори аденовірусів або ретровірусів, що дозволяють інфікувати попередньо вибрані тканини-мішені. Найкращим є вірус спроможної до реплікації саркоми птахів (CSPC), описаний тут.

Можна створити системи клітин ссавців, які використовують рекомбінантні віруси або вірусні елементи для спрямовування експресії. Наприклад, при використанні аденовірусних векторів експресії кодуєча послідовність поліпептиду може бути лігована з комплексом управління транскрипцією/трансляцією аденовірусу, наприклад, останній промотор та трійчаста лідерна послідовність. Цей химерний ген може потім бути вставлений у геном аденовірусу шляхом рекомбінації *in vitro* або *in vivo*. Наслідком вставки в несуттєву область вірусного геному (наприклад, область E1 або E3) буде виникнення рекомбінантного вірусу, який є життєздатним та спроможним до експресії поліпептиду в інфікованих хазяїнах [наприклад, див. Logan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659 (1984)]. Іншим чином, можна використовувати промотор вірусу коров'ячої віспи 7.5K [наприклад, див. Mackett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419 (1982); Mackett et al., J. Virol., 49:857-864 (1984); Panicali et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79:4927-4931 (1982)]. Особливий інтерес представляють вектори, засновані на вірусі бичачої папіломи, яку мають здібність до реплікації як екстрахромосомні елементи [Sarver et al., Mol. Cell. Biol., 1:486 (1981)]. Безпосередньо після введення цієї ДНК у клітині-мішені плазмід реплікує приблизно від 100 до 200 копій на клітину. Транскрипція введеної кДНК не потребує інтеграції плазміди до хромосому клітини-хазяїна, що, таким чином, забезпечує високий рівень експресії. Ці вектори можуть бути використані для стійкої експресії шляхом включення селективного маркера в плазміді, наприклад, ген нео. В іншому варіанті геном ретровірусу може бути модифікований для використання як вектор, спроможний впроваджувати та

спрямовувати експресію нуклеотидної послідовності, що кодує поліпептид, в клітині-хазяїні [Cone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6349-6353 (1984)]. Експресії високого рівня можна також досягти шляхом використання індукованих промоторів, включаючи промотор IIA металотіонін і промотори теплового шоку, але не обмежуючись лише ними.

Останнім часом вивчалось довгострокове виживання промотору цитомегаловірусу (ЦМВ) у порівнянні з стимульованою промотором вірусу саркоми Руса (BCP) генною терапією тимідинкіназою (ТК) у "голих" мишей, заражених раком яєчників людини. Було виявлено, що ефективність вбивання клітин стимульованого промотором ЦМВ аденовірусного простого герпесу в порівнянні з генною терапією ТК у 2-10 рази перевищує ефективність терапії, стимульованої BCP [Tong et al., 1999, *Hybridoma*. 18(1):93-97]. Також була описана модель химерних промоторів для застосування в генній терапії, для яких потрібна експресія низького рівня, за якою слідує експресія високого рівня [Suzuki et al., 1996, *Human Gene Therapy*, 7:1883-1893].

Для довгострокового високопродуктивного побудування рекомбінантних білків віддають перевагу стабільній експресії. Замість того, щоб використовувати вектори експресії, які містять вірусні початки реплікації, клітини-хазяїни можуть бути перетворені кДНК, регульованою відповідними елементами контролю експресії (наприклад, послідовності промотору та енхансеру, термінатори транскрипції, сайти поліаденілування тощо) і селектованим маркером. Як згадувалось вище, селектований маркер у рекомбінантній плазміді надає стійкість до селекції і дозволяє клітинам стабільно інтегрувати плазмиду до своїх хромосом та зростати, створюючи осередки, які, в свою чергу, можуть бути клоновані та перетворені у лінії клітин.

Наприклад, після введення чужорідної ДНК сконструйованим клітинам може бути дозволено зростати протягом 1-2 днів у збагачених середовищах, після чого їх переспрямовують у вибірні середовища. Можна використовувати ряд систем селекції, включаючи (але не обмежуючись лише ними) гени тимідинкінази вірусу простого герпесу [Wigler et al., *Cell*, 11:223 (1977)], гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази [Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 48:2026 (1962)] та аденинфосфорибозилтрансферази [Lowy et al., *Cell*, 22:817 (1980)], які можна використовувати в клітинах tk, hprt та ap^rt відповідно. Крім того, як основу для селекції можна використовувати гени-антиметаболіти, які надають стійкість; наприклад, гени для dhfr, що надає стійкість до метатрексату [Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 77:3567 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 78:1527 (1981)]; gpt, що надає стійкість до мікофенолової кислоти [Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 78:2072 (1981)]; neo, що надає стійкість до аміноглікозиду G-418 [Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1981)]; та hyg^r, що надає стійкість до гігromіцину [Santerre et al., *Gene*, 30:147 (1984)]. Нещодавно були описані додаткові селектовані гени, а саме trpB, який дозволяє клітинам використовувати індол замість триптофану; hisD, який дозволяє клітинам використовувати гістидин

замість гістидину [Hartman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 85:804 (1988)]; та ОДК (орнітиндекарбоксилаза), яка надає стійкість до інгібітору орнітиндекарбоксилази, 2-(дифторметил)-DL-орнітину, ДФМО (McConlogue L., в кн.: "Сучасні системи передачі в молекулярній біології", під ред. "Колд Спрінг Харбор Лебораторі" ("Cold Spring Harbor Laboratory") (1987)].

Основні вектори, розглянуті для генної терапії людини, виводять з ретровірусних джерел [Wilson, 1997, *Clin. Exp. Immunol.*, 107 (Додаток 1):31-32; Bank et al., 1996, *Bioessays*, 18(12):999-1007; Robbins et al., 1998, *Pharmacol. Ther.*, 80(1):35-47]. Терапевтичний потенціал переносу генів та десенсибілізуючої терапії стимулював розвиток багатьох векторних систем для лікування ряду тканин (судинної мережі, [Stephan et al., 1997, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 11(2):97-110; Feldman et al., 1997, *Cardiovasc. Res.* 35(3):391-404; Vassalli et al., 1997, *Cardiovasc. Res.*, 35(3):459-69; Baek et al., 1998, *Circ. Res.* 82(3):295-305]; нирки, [Lien et al., 1997, *Kidney Int. Suppl.*, 61:585-8]; печінки, [Ferry et al., 1998, *Hum Gene Ther*, 9(14): 1975-81]; м'язів, [Marshall et al., 1998, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 8(3):360-5]. Крім цих тканин, важливою мішенню генної терапії людини є рак, як сама пухлина, так і пов'язані з нею тканини [Runnebaum, 1997, *Anticancer Res.*, 17(4B):2887-90. Spear et al., 1998, *J. Neurovirol.*, 4(2): 133-47].

Нижче стисло описуються конкретні приклади векторних систем вірусної генної терапії, які легко пристосовуються для використання в способах згідно з цим винаходом. Перенос ретровірусних генів був нещодавно проаналізований Federspiel та Hughes [1998, *Methods in Cell Biol.*, 52:179-214], які, зокрема, описали сім'ю ретровірусів вірусу лейкозу птахів (ВЛП) [Federspiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 93:4931 (1996); Federspiel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 91:11241 (1994)]. Ретровірусні вектори, включаючи ВЛП і вірус лейкемії мишей (ВЛМ), пізніше були описані Svoboda [1998, *Gene*, 206:153-163].

Модифіковані системи ретровірусної/аденовірусної експресії можуть бути легко пристосовані для реалізації способів згідно з цим винаходом. Наприклад, системи вірусу лейкемії мишей (ВЛМ) [розглянуті Karavanas et al., 1998, *Crit. Rev. in Oncology/Hematology*, 28:7-30]. Системи аденовірусної експресії розглянуті Von Seggern та Nemerow у кн.: "Системах експресії генів" [під ред. Фернандеза та Хофлера, "Академік Пресе". ("Academic Press"), Сан Дієго, Каліфорнія, 1999, гл.5, стор.112-157].

Було продемонстровано, що системи експресії білків можуть бути ефективно використані як *in vivo*, так і *in vitro*. Наприклад, був описаний ефективний перенос генів у лускатоклітинну пухлину людини амплікон-вектором вірусу простого герпесу (ВПГ) типу 1 [Carev et al., 1998, *Am. J. Surg.*, 176:404-408]. Вірус простого герпесу використовують для переносу генів у нервову систему [Goins et al., 1997, *J. Neurovirol.*, 3 (Додаток 1):580-8]. Спрямовані суїцидальні вектори з використанням ВПГ-ТК були протестовані на твердих пухлинах [Smiley et al., 1997, *Hum. Gene Ther.*, 8(8):965-77]. Вектор вірусу простого герпесу типу 1 використо-

ували для генної терапії раку на клітинах карциноми ободової кишки [Yoon et al., 1998, *Ann. Surg.*, 228(3):366-74]. Гібридні вектори були удосконалені для збільшення періоду трансфекції, включаючи гібриди (ВПГ/ААВ) (аденоасоційований вірус) для лікування гепатоцитів [Fraefel et al., 1997, *Mol. Med.*, 3(12):813-825].

Вірус коров'ячої віспи був удосконалений для генної терапії людини завдяки своєму великому геному [(Peplinski et al., 1998, *Sura. Oncol. Clin. N. Am.*, 7(3):575-88)]. Було описане використання вірусу коров'ячої віспи з видаленою тимідинкіназою з експресією пуринової нуклеозидпірофосфорилази як вектору генної терапії, спрямованої на пухлину [Puhlman et al., 1999, *Human Gene Therapy*, 10:649-657].

Було описане використання аденоасоційованого вірусу 2 (ААВ) в генній терапії людини, проте ААВ потребує допоміжного вірусу (наприклад, аденовірусу або вірусу герпесу) для оптимальної реплікації та упакування в клітинах ссавців. [Snoeck et al., 1997, *Exp. Nephrol.*, 5(6):514-20; Rabinowitz et al., 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):470-5]. Проте було описане упакування *in vitro* інфекційного рекомбінантного ААВ, що, тим самим, зробило цю систему значно більш перспективною [Ding et al., 1997, *Gene Therapy*, 4:1167-1172]. Було показано, що викликана ААВ передача кДНК екотропічного ретровірусного рецептора уможливорює екотропічну трансдукцію ретровірусу сталих та початкових клітин людини [Qing et al., 1997, *J. Virology*, 71(7):5663-5667]. Була продемонстрована генна терапія раку з використанням вектора ААВ, що експресував p53 людини природного типу [Qazilbash et al., 1997, *Gene Therapy*, 4:675-682]. Також було показано передачу гена в судинні клітини з використанням ААВ векторів [Maeda et al., 1997, *Cardiovascular Res.*, 35:514-521]. ААВ був показаний як придатний вектор для генної терапії, спрямованої на печінку [Xiao et al., 1998, *J. Virol.*, 72(12): 10222-6]. Були описані вектори ААВ для застосування в генній терапії тканин мозку та центральної нервової системи [Chamberlin et al., 1998, *Brain Res.*, 793(1-2): 169-75; During et al., 1998, *Gene Therapy*, 5(6):820-7]. Також вектори ААВ були порівняні з аденовірусними векторами (АдВ) для генної терапії легенів та передавання до клітин епітелію людини з міхуровим фіброзом [Teramoto et al., 1998, *J. Virol.*, 72(11):8904-12].

Векторні системи генної терапії химерними аденовірусами та ретровірусами включають корисні властивості кожного вірусу для створення неінтегрованого аденовірусу, який стає функціонально інтегрованим за допомогою проміжного утворення ретровірусної клітини-продуцента [Feng et al., 1997, *Nat. Biotechnology*, 15(9):866-70; Bilbao et al., 1997, *FASEB J.*, 11(8):624-34]. Це могутнє нове покоління векторів генної терапії було пристосовано для цілеспрямованої генної терапії раку [Bilbao et al., 1998, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 451:365-74]. Разова ін'єкція аденовірусу з експресією p53 інгібувала зростання вузликів підшкірної пухлини знесилених ракових клітин людини [Asgari et al., 1997, *Int. J. Cancer*, 71(3):377-82]. Було описане генне перенесення натурального p53, викликане аденовірусами, у пацієнтів з пізньою стадією раку легенів з

великими клітинами [Schuler et al., 1998, *Human Gene Therapy*, 9:2075-2082]. Цей же вид раку був об'єктом терапії заміщенням гена p53 за допомогою векторів аденовірусів [Roth et al., 1998, *Semin. Oncol.*, 25 (3 Додаток 8):33-7]. Генний перенос p53 за допомогою аденовірусів інгібує диференціацію ендотеліальних клітин та ангиогенез *in vivo* [Riccioni et al., 1998, *Gene Ther.*, 5(6):747-54]. Була також описана викликана аденовірусами експресія антигену меланоми gp75 як імунотерапія метастатичної меланоми [Hirschowitz et al., 1998, *Gene Therapy*, 5:975-983]. Аденовірус полегшує інфікування клітин людини екотропічним ретровірусом та підвищує ефективність ретро вірусної інфекції [Scott-Taylor et al., 1998, *Gene Ther.*, 5(5):621-9]. Вектори аденовірусів використовували для генного перенесення до васкулярних клітин гладких м'язів [Li et al., 1997, *Chin. Med. J. (Engl.)*, 100(12):950-4], клітин плоскостінного раку [Goebel et al., 1998, *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 119(4):331-6], клітин раку стравоходу [Senmaru et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 78(3):366-71], мезангіальних клітин [Nahman et al., 1998, *J. Investig. Med.*, 46(5):204-9], гліальних клітин [Chen et al., 1998, *Cancer Res.*, 58(16):3504-7] та до суглобів тварин [Ikeda et al., 1998, *J. Rheumatol.* 25(9): 1666-73]. Зовсім нещодавно було продемонстроване перикардальне генне перенесення за допомогою катетера, викликане векторами AcV [March et al., 1999, *Clin. Cardiol.*, 22(1, Додаток 1): 123-9]. Маніпулювання системою аденовірусів відповідними регулюючими генетичними елементами уможливорює регульовану цілеспрямовану генну експресію за допомогою аденовірусу *in vivo* [Burcin et al., 1999, *PNAS (USA)*, 96(2):355-60].

Вектори альфа-вірусів були вдосконалені для застосування в генній терапії людини з лініями клітин упакування, придатними для трансформації касетами експресії, придатними для використання з вірусом Сіндбис та векторами вірусного походження Семліки Форест [Polo et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 96:4598-4603]. Були також розроблені флавівірусні репліконові системи на основі РНК, які не відносяться до захворювання клітин [Varaavski et al., 1999, *Virology*, 255(2):366-75]. Вектори вірусу сінбис, які містять ген-самогубець ВПГ-ТК, використовувалися для спрямування до конкретних клітин пухлини [Iijima et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 80(1): 110-8].

Ретровірусні вектори на основі пінистого вірусу людини (ПВЛ) є також перспективними як вектори генної терапії [Trobridge et al., 1998, *Human Gene Therapy*, 9:2517-2525]. Вектори пінистих вірусів були сконструйовані для терапії генами-самогубцями [Nestler et al., 1997, *Gene Ther.*, 4(11): 1270-7]. Рекомбінантний цитомегаловірус мишей та системи промоторів також використовувалися як вектори для експресії високого рівня [Manning et al., 1998, *J. Virol. Meth.*, 73(1):31-9; Tong et al., 1998, *Hybridoma*, 18(1):93-7].

Доставка генів до клітин, які не діляться, стала здійсненною завдяки утворенню векторів на основі вірусу Сендай [Nakanishi et al., 1998, *J. Controlled Release*, 54(1):61-8].

В інших спробах уможливити трансформацію соматичних клітин, що не діляться, були дослі-

джені лентивірусні вектори. Була описана генна терапія фіброзно-кістозної дегенерації з використанням вектора на основі вірусу імунodefіциту людини (ВІЛ) з відсутністю реплікації [Goldman et al., 1997, Human Gene Therapy, 8:2261-2268]. Була також продемонстрована тривала експресія генів, які доставляються в печінку та м'язи лентивірусними векторами [Kafri et al., 1997, Nat. Genet., 17(3):314-7]. Проте переважає турбота про безпеку, і розробка удосконалених векторів йде швидкими темпами [Kim et al., 1998, J. Virol., 72(2):994-1004]. Дослідження LTR-послідовності (довгого кінцевого повтору) ВІЛ і білка Tat надає важливу інформацію про структуру геному для розробки векторів [Sadaie et al., 1998, J. Virol., 72(2):994-1004]. Таким чином, зараз є краще зрозумілими генетичні вимоги до ефективного вектора на основі ВІЛ (Gasmi et al., 1999, J. Virol., 73(3): 1828-34). Були описані вектори, які самоінактивуються, або умовні лінії клітин упакування [наприклад, Zuffery et al., 1998, J. Virol., 72(12):9873-80; Miyoshi et al., 1998, J. Virol., 72(10):8150-7; Dull et al., 1998, J. Virol., 72(11):8463-71; та Kaul et al., 1998, Virology, 249(1): 167-74]. Була продемонстрована ефективна трансдукція лімфоцитів людини і клітин CD34+ векторами ВІЛ [Douglas et al., 1999, Hum. Gene Ther., 10(6):935-45; Miyoshi et al., 1999, Science, 283(5402):682-6]. Була описана ефективна трансдукція клітин людини, які не діляться, лентивірусними векторами вірусу імунodefіциту кішок (ВІК), яка мінімізує турботи про безпеку при використанні векторів на основі ВІЛ [Poeschla et al., 1998, Nature Medicine, 4(3):354-357]. Було продемонстровано продуктивне інфікування мононуклеарних клітин крові людини векторами ВІК [Johnston et al., 1999, J. Virol. 73(3):2491-8].

Оскільки з багатьма вірусними векторами важко поводитися, і спроможність до вставки ДНК обмежена, дослідження були спрямовані на ці обмеження та недоліки. Наприклад, крім спрощених вірусних ліній клітин упакування, для полегшення маніпулювання генетичним матеріалом та створення вірусних векторів були розроблені міні-вірусні вектори, отримані з вірусу герпесу людини, вірусу простого герпесу типу I (ВПГ-1) та вірусу Епштейна-Барра (ВЕБ) [Wang et al., 1996, J. Virology, 70(12):8422-8430]. Раніше було продемонстровано, що адапторні плазмідні спрощують вставку чужорідної ДНК у ретровірусні вектори, незалежні від вірусів-помічників [1987, J. Virology. 61(10):3004-3012].

Вірусні вектори не є єдиним засобом здійснення генної терапії, оскільки було також описано кілька невірусних векторів. Було продемонстровано, що результатом дії спрямованого невірусного вектора генної доставки на основі використання полісплетення епідермального фактора росту (ЕФР) та ДНК (ЕФР/ДНК) є ефективна та конкретна доставка генів [Cristiano, 1998, Anticancer Res., 18:3241-3246]. Була продемонстрована генна терапія судинної мережі та ЦНС з використанням катіонних ліпосом [Yang et al., 1997, J. Neurotrauma, 14(5):281-97]. Була також здійснена короточасна генна терапія панкреатиту з використанням катіонних ліпосом [Denham et al., 1998, Ann. Surg., 227(6):812-20]. Було продемонстровано, що ефек-

тивними для генної доставки є комплекси вектора на основі хітозану та ДНК [Erbacher et al., 1998, Pharm. Res., 15(9): 1332-9]. Був описаний невірусний вектор доставки ДНК на основі триплексної системи [Kim et al., 1998, 53(1-3): 175-82]. Комплекси ліпосом, покритих частками вірусів, також використовувалися для здійснення генного переносу [Hirai et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 241(1): 112-8].

Була продемонстрована генна терапія раку прямими ін'єкціями в пухлину невірусного вектора Т7, який кодує ген тимідинкінази [Chen et al., 1998, Human Gene Therapy, 9:729-736]. Готування плазмідної ДНК є важливим для генного переносу прямими ін'єкціями [Horn et al., 1995, Hum. Gene Ther., 6(5):656-73]. Модифіковані плазмідні вектори були пристосовані конкретно для прямих ін'єкцій [Hartikka et al., 1996, Hum. Gene Ther., 7(10): 1205-17].

Таким чином, у цій галузі техніки відомий широкий ряд векторів та конструкцій генного переносу/генної терапії. Ці вектори можна легко пристосувати для використання в способах згідно з цим винаходом. Шляхом відповідного маніпулювання з використанням технологій рекомбінантної ДНК/молекулярної біології для вставки оперативно зчепленого Src (як активного, так і неактивного) в обраний вектор експресії/доставки можна утворити багато еквівалентних векторів для реалізації цього винаходу.

Е. Способи модулювання ангиогенезу

Цей винахід забезпечує спосіб модулювання ангиогенезу у тканині, пов'язаний з процесом або станом захворювання, за допомогою чого в тканині здійснюються ті процеси, що залежать від ангиогенезу. Взагалі цей спосіб включає застосування до тканини, пов'язаної з процесом або станом захворювання, сполуки, яка містить достатню для модулювання ангиогенезу кількість Src-білка або вектора нуклеїнової кислоти, що здійснює експресію активного або неактивного Src.

Як описано тут, в будь-якій з ряду тканин або органів, що складаються з органічних тканин, може бути підтриманий ангиогенез в станах захворювання, включаючи шкіру, м'язи, кишки, сполучну тканину, суглоби, кістки і подібні тканини, у яких можуть виникати кровоносні судини при впливі ангиогенних стимулів.

Краще, якщо пацієнт, якого лікують згідно з цим винаходом у багатьох варіантах його реалізації, є людиною, хоча слід розуміти, що основні принципи винаходу вказують на те, що винахід є ефективним стосовно всіх ссавців, які, як передбачається, повинні бути включені до терміну "пацієнт". У цьому контексті розуміється, що до поняття "ссавець" включені усі види ссавців, для яких є бажаним лікування тканини, пов'язаної з захворюваннями, з якими пов'язаний ангиогенез, зокрема, види сільськогосподарських та свійських ссавців.

Таким чином, цей спосіб включає прописування пацієнту терапевтично ефективної кількості фізіологічно придатної сполуки, що містить Src-білок або вектор ДНК для експресії Src-білка для реалізації способів згідно з цим винаходом.

Дози для прописування Src-білка змінюються в залежності від форми білка та його ефективності,

як тут описується далі. Кількість дози є достатньо великою для забезпечення бажаного ефекту, при якому ангиогенез та симптоми захворювання, пов'язані з розвитком кровоносних судин, поліпшуються. Проте дози не повинні бути настільки великі, щоб викликати несприятливі побічні ефекти, наприклад, синдроми підвищеної грузькості, набряк легенів, закупорку серцевих судин тощо. Взагалі, доза залежить від віку, статі, стану пацієнта, ступеня розвитку хвороби пацієнта і може бути легко визначена спеціалістом у цій галузі. У випадку будь-яких ускладнень доза також може регулюватися особистим лікарем.

Терапевтично ефективна кількість складає таку кількість Src-білка або нуклеїнової кислоти, яка кодує (активний або неактивний) Src-білок, достатній для здійснення помітного модулювання ангиогенезу у тканинах, підданих лікуванню, тобто кількість, достатню для модулювання ангиогенезу. Модулювання ангиогенезу може бути обмірено аналізом ХАМ, як тут описано, або будь-якими іншими методами, відомими спеціалісту у цій галузі техніки.

Src-білок або вектор нуклеїнової кислоти, який експресує Src-білок, можна назначати парентеральним способом шляхом ін'єкції або шляхом поступового вливання протягом часу. Хоча звичайно тканина тіла, яка потребує лікування, може бути доступна шляхом систематичного лікування, і, отже, частіше усього обробляється шляхом внутрішньовенних впливань терапевтичних сполук, розглядаються й інші тканини та засоби доставки. Таким чином, сполуки згідно з цим винаходом можуть бути введені внутрішньовенним, внутрішньочеревним, внутрішньом'язовим, підшкірним, внутрішньопорожнинним та кризьшкірним шляхом і можуть бути доставлені перистальтичними засобами.

Терапевтичні сполуки, які містять Src-білок або вектор нуклеїнової кислоти, який експресує Src-білок, звичайно можна ввести внутрішньовенним шляхом, як, наприклад, при ін'єкції разової дози. Термін "разова доза" стосовно до терапевтичної сполуки згідно з цим винаходом позначає фізично дискретні одиниці, які є придатними як одиничні дози для суб'єкта, причому кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активного компонента, визначеного для одержання бажаного терапевтичного ефекту у поєднанні з необхідним розріджувачем; тобто носієм або наповнювачем.

В одному з кращих варіантів реалізації цього винаходу реагент вводиться єдиною дозою внутрішньовенним шляхом. Локальне введення може бути здійснене шляхом прямої ін'єкції або шляхом використання анатомічно ізольованих відділів, які ізолюють мікроциркуляцію систем органа-мішені, реперфузію системи циркуляції, або тимчасову закупорку на основі катетера областей-мішеней судинної мережі, пов'язаної з хворими тканинами.

Сполуки водяться способом, сумісним з формою дози та в терапевтично ефективній кількості. Кількість та час введення залежить від об'єкта, який піддається лікуванню, спроможності систем об'єкта до вживання активного інгредієнта та ступеню бажаного терапевтичного ефекту. Точна кількість активного інгредієнта, необхідна для вве-

дення, залежить від думки спеціаліста та є індивідуальною для кожного пацієнта. Проте придатні діапазони дози для систематичного застосування тут розкриті і залежать від шляху введення. Придатні режими введення також різноманітні, але типізовані за початковим введенням, після якого слідує повторні введення доз з інтервалом в 1 або більш годин шляхом наступної ін'єкції або іншого виду введення. В альтернативному варіанті розглядаються постійні внутрішньовенні вливання, достатні для підтримання концентрації в крові в межах, зазначених для лікування *in vivo*.

1. Інгібування ангиогенезу.

Інгібування ангиогенезу є важливим при різноманітних захворюваннях, які називаються ангиогенними захворюваннями. Такі захворювання включають, не обмежуючись лише цим, запальні розлади, наприклад, алергічне і неалергічне запалення, хронічний суглобний ревматизм та псоріаз, розлади, пов'язані з невідповідною або невчасною інвазією судин, наприклад, діабетичну ретинопатію, неоваскулярну глаукому, рестеноз, капілярну проліферацію в атеросклеротичних бляшках та остеопороз, і розлади, пов'язані з раком, наприклад, тверду пухлину, метастази твердої пухлини, ангиофіброми, ретролентальну фіброплазію, гемангіоми, саркому Капоші і подібні ракові захворювання, які потребують неоваскуляризації для підтримання зростання пухлини.

Таким чином, методи, які інгібують ангиогенез у тканині, пов'язаній із станом захворювання, покращують симптоми захворювання і, в залежності від захворювання, можуть сприяти лікуванню хвороби. В одному варіанті реалізації у винаході розглядається інгібування ангиогенезу, по суті, у тканині, пов'язаній із станом захворювання. Ступінь ангиогенезу у тканині, а отже, і ступінь інгібування, досягнутий за допомогою сучасних методів, може бути оцінений рядом способів.

Так, в одному з варіантів реалізації винаходу тканиною, яку необхідно вилікувати, є запалена тканина, і ангиогенезом, який необхідно інгібувати, є ангиогенез запаленої тканини там, де спостерігається неоваскуляризація запаленої тканини. У цьому класі спосіб розглядає інгібування ангиогенезу в артричних тканинах, наприклад, у пацієнтів з хронічним суглобним ревматизмом, в алергічних та неалергічних запаленнях тканин, у псоріатичних тканинах тощо.

В іншому варіанті реалізації винаходу тканиною, яку необхідно вилікувати, є тканина сітківки пацієнта з захворюванням сітківки, наприклад, діабетичною ретинопатією, виродженням плям або неоваскулярної глаукоми, та ангиогенезом, який необхідно інгібувати, є ангиогенез тканини сітківки там, де спостерігається неоваскуляризація тканини сітківки.

У додатковому варіанті реалізації винаходу тканиною, яку необхідно вилікувати, є тканина пухлини пацієнта з твердою пухлиною, метастазами, раком шкіри, раком грудей, гемангіомою або ангиофібромою, та подібними видами раку, і ангиогенезом, який необхідно інгібувати, є ангиогенез тканини пухлини там, де спостерігається неоваскуляризація тканини пухлини. Типові тканини твердої пухлини, які піддаються лікуванню за

допомогою сучасних методів, включають тканини легенів, підшлункової залози, грудей, товстої кишки, гортані, яєчників і подібні тканини. Інгібування ангиогенезу тканин пухлини є найкращим варіантом реалізації винаходу внаслідок важливої ролі, яку відіграє неоваскуляризація у зростанні пухлини. При відсутності неоваскуляризації тканин пухлини тканина пухлини не одержує необхідних живильних речовин, уповільнює зростання, припиняє додаткове зростання, регресує і, в кінцевому рахунку, перетворюється на некротичну, що призводить до загибелі пухлини.

Іншими словами, у цьому винаході передбачений спосіб інгібування неоваскуляризації пухлини шляхом інгібування ангиогенезу пухлини згідно з сучасними методами. Аналогічним чином у винаході передбачений спосіб інгібування зростання пухлини шляхом реалізації методів інгібування ангиогенезу.

Ці способи також особливо ефективні проти створення метастаз внаслідок того, що (1) їхнє утворення потребує васкуляризації первинної пухлини, щоб метастатичні клітини рака могли покинути первинну пухлину та (2) їхнє утворення в повторному осередку потребує неоваскуляризації для підтримання зростання метастаз.

В одному з варіантів реалізації цього винаходу у ньому передбачена реалізація способу разом з іншими методами лікування, наприклад, традиційною хіміотерапією, спрямованою проти твердої пухлини і призначено, для контролю утворення метастаз. Застосування інгібітору ангиогенезу звичайно здійснюється під час або після хіміотерапії, хоча бажано інгібувати ангиогенез після режиму хіміотерапії в той час, коли тканина пухлини буде реагувати на токсичну атаку стимулюванням ангиогенезу для відновлення шляхом подачі крові та живильних речовин до тканини пухлини. Крім того, бажано призначати способи інгібування ангиогенезу після хірургічного втручання, при якому тверда пухлина була видалена як профілактика проти метастаз.

Оскільки ці сучасні методи використовуються для інгібування неоваскуляризації пухлини, їх можна також застосовувати і для інгібування зростання тканин пухлини, для інгібування утворення метастаз пухлини і для регресії утворених пухлин.

Рестеноз є процесом міграції клітин гладкої мускулатури (КГМ) до проліферації в тканину в місці підшкірної транспорожнинної коронарної пластичної операції на судинах, що утрудняє досягнення успіху при пластичній операції на судинах. Міграцію та проліферацію КГМ під час рестенозу можна розглядати як процес ангиогенезу, який можна інгібувати за допомогою сучасних методів. Отже, у винаході також розглядається інгібування у пацієнта рестенозу шляхом інгібування ангиогенезу згідно з сучасними методами, за яким слідує процедури операції на судинах. Для інгібування рестенозу звичайно призначають інактивовану тирозинкіназу після процедури операції на судинах внаслідок ризику рестенозу для стінок коронарних судин, звичайно протягом від 2 до 28 днів, а більш звичайно - протягом перших 14 днів після операції.

Цей метод інгібування ангиогенезу у тканинах, пов'язаних із станом захворювання, а. отже, і ре-

лізації методів лікування захворювань, пов'язаних із ангиогенезом, включає контакт тканини, у якій відбувається ангиогенез, або яка знаходиться під ризиком виникнення ангиогенезу, із сполукою, що містить терапевтично ефективну кількість інактивованого Src-білка або вектора експресії цього білка.

Інгібування ангиогенезу і регресія пухлини відбувається через 7 днів після початкового контакту з терапевтичною сполукою. Додаткова або більш тривала взаємодія з інактивним білком Src краще триває протягом від 7 днів до 6 тижнів, краще від 14 до 28 днів.

2. Посилення ангиогенезу

У випадках, в яких бажано підтримувати або стимулювати ангиогенез, корисно призначати до тканини активний Src-білок. Засоби та час призначення сумісні з методами, описаними вище для інгібування ангиогенезу.

Г. Терапевтичні сполуки

У цьому винаході розглядаються терапевтичні сполуки, корисні для реалізації описаних тут терапевтичних методів. Терапевтичні сполуки згідно з цим винаходом містять фізіологічно придатний носій разом з білком Src або вектором, здатним до експресії Src-білка, як описано тут, розчинним або розподіленим у ньому як активний компонент. У кращому варіанті реалізації винаходу терапевтична сполука не є імуногенною при призначенні ссавцям або людям у терапевтичних цілях.

При використанні тут терміни "фармацевтично припустимий", "фізіологічно придатний" та їхні граматичні варіанти у відношенні сполук, носіїв, розчинників та реагентів використовуються взаємозамінним чином і означають, що ці матеріали можна призначати ссавцям без виникнення небажаних фізіологічних ефектів, таких, як нудота, запаморочення, розлад шлунка тощо.

Готування фармакологічної сполуки, що містить активні інгредієнти, розчинені або розподілені в неї, є добре відомим у цій галузі техніки і не потребує обмеження на основі формули. Звичайно такі сполуки готують у вигляді ін'єкцій рідин або суспензій, проте можна приготувати і тверді форми, придатні для розчинення або суспензування в рідині перед використанням. Препарат можна також емульгувати або представити у вигляді ліпосомної сполуки.

Активний інгредієнт можна змішати з наповнювачами, які є фармацевтично прийнятними і сумісними з активним інгредієнтом, і в кількостях, придатних для використання в описуваних тут терапевтичних методах. Придатними наповнювачами є, наприклад, вода, соляний розчин, декстроза, гліцерин, етанол або подібні їм наповнювачі та їхні комбінації. Крім того, при необхідності сполука може містити незначні кількості допоміжних речовин, наприклад, агентів, що змочують або емульгують, рН-буферних агентів і тому подібних речовин, що посилюють ефективність активного інгредієнта.

Терапевтична сполука згідно з цим винаходом може містити фармацевтично припустимі солі з будь-яких солетворних компонентів. Фармацевтично припустимі солі включають солі з додаванням кислот (утворені вільними аміногрупами поліпеп-

тиду), які утворюються такими неорганічними кислотами, як, наприклад, соляна або фосфорна кислоти, або такими органічними кислотами, як, наприклад, оцтова, винна, мигдальна тощо. Солі, утворені вільними карбоксильними групами, можуть бути також отримані з неорганічних основ, наприклад, таких, як гідроксиди натрію, калію, амонію кальцію або заліза, та органічних основ, наприклад, таких, як ізопропіламін, триметиламін 2-2-етиламіноетанол, гістидин, прокат тощо.

Фізіологічно придатні носи для активних інгредієнтів добре відомі в цій галузі техніки. Зразковими рідкими носіями є стерильні водяні розчини, які не містять ніяких інших речовин, крім активних інгредієнтів та води, або містять буфер, наприклад фосфат натрію з фізіологічним значенням pH, фізіологічний соляний розчин або обидва наприклад, у вигляді фосфат-буферного соляного розчину. Крім того, водяні носії можуть містити більш однієї буферної солі, а також такі солі, як хлориди натрію та калію, декстроза, поліетиленгліколь та інші розчини.

Рідкі сполуки можуть також містити рідкі фази крім води або замість її. Прикладами таких додаткових рідких фаз є гліцерин, рослинні олії, наприклад, бавовняна олія, та водомасляні емульсії.

Терапевтична сполука містить достатню для модулювання ангіогенезу кількість Src-білка згідно з цим винаходом або достатнього вектору експресії рекомбінантної ДНК для експресії ефективної кількості Src-білка, і звичайно має такий склад, що містить принаймні 0,1 вагових відсотка Src-білка від ваги всієї терапевтичної сполуки. Ваговий відсоток є ваговим співвідношенням Src-білка та всієї сполуки. Таким чином, наприклад, 0,1 вагових відсотка складає 0,1г Src-білка на 100г всієї сполуки. Для векторів експресії ДНК призначувана кількість залежить від властивостей вектора експресії, тканини, яку треба піддати лікуванню, і подібних міркувань.

G. Виріб

У винаході також розглядається виріб, який є маркованим контейнером для забезпечення Src-білка згідно з цим винаходом. Виріб включає пакувальний матеріал, забезпечений відповідним маркуванням із вказівкою стана захворювання, який потрібно вилікувати, і фармацевтичним агентом, що міститься всередині пакувального матеріалу.

Фармацевтичний агент у виробі є будь-якою зі сполук згідно з цим винаходом, придатною для забезпечення Src-білка та виготовленою у вигляді фармацевтично припустимої форми, як описано тут, відповідно до викладених показань. Таким чином, сполука може містити Src-білок або молекулу ДНК, яка має спроможність до експресії Src-білка. Виріб містить кількість фармацевтичного агента, достатню для використання у лікуванні зазначеного на упаковці стана, як в разових, так і в багаторазових дозах.

Пакувальний матеріал містить етикетку, на якій зазначене використання фармацевтичного агента, що міститься у ньому, наприклад, для лікування станів, яким може сприяти інгібування або посилення ангіогенезу, та подібних викладених на ній станів. Етикетка може, крім того, включати інструкції з використання і іншу пов'язану інформа-

цію, яка може знадобитися для продажу. Пакувальний матеріал може включати контейнер(и) для зберігання фармацевтичного агента.

При використанні в цьому описі терміном "пакувальний матеріал" позначають такий матеріал, як скло, пластмаса, папір, фольга та подібні матеріали, які можуть утримувати фіксувальними засобами фармацевтичний агент. Таким чином, наприклад, пакувальний матеріал може бути пластмасовою або скляною пробіркою, багатошаровою обгорткою і подібними контейнерами, використовуваними для утримання фармацевтичної сполуки, яка містить фармацевтичний агент.

У кращих варіантах реалізації винаходу пакувальний матеріал включає етикетку, яка є реальним описом вмісту виробу та використання фармацевтичного агента, який міститься в ньому.

Приклади

Наступні приклади, які відносяться до винаходу, є ілюстративними і, звичайно, не повинні тлумачитися як такі, що зокрема обмежують винахід. Більш того, такі варіації винаходу, що відомі зараз або будуть розроблені пізніше і які знаходяться в межах компетенції спеціаліста у цій галузі техніки, повинні розглядатися як такі, що знаходяться в межах цього заявленого нижче винаходу.

1. Готування конструкції експресії c-Src

Для приготування конструкції експресії, корисної при моделюванні ангіогенезу за допомогою способів згідно з цим винаходом здійснюють маніпулювання кДНК c-Src та її вставку в конструкцію/вектор експресії.

Послідовність кДНК, яка кодує натуральний (наприклад, ендогенний) c-Src курчат, показана на Фіг.1 (ідент. № посл.: 2), а кодована послідовність амінокислотних залишків показана на Фіг.2 (ідент. № посл.: 3). Кодовану білкову послідовність трансклюють з нуклеотидних положень кДНК 112 до 1713. Послідовність нуклеїнової кислоти, яка відповідає послідовності нуклеїнової кислоти людської кДНК c-Src (ідент. № посл.: 4), і кодовані послідовності амінокислотних залишків (ідент. № посл.: 5) показані на Фіг.3 і 4 відповідно. Для білкової послідовності людини кодує послідовність починається в нуклеотидному положенні 134 до 1486 кДНК.

Були приготовлені натуральні, а також ряд видозмінених кДНК c-Src. Видозмінені конструкції c-Src були приготовлені шляхом сайт-специфічного мутагенезу, як це було [описано Kaplan et al., EMBO J., 13:4745-4576(1994)]. Видозмінені конструкції c-Src для кодування видозмінених білків c-Src для використання у способах згідно з цим винаходом [описані у Kaplan et al., там же. Kaplan et al.] описують різноманітні видозмінені конструкції c-Src і кодовані білки, корисні для реалізації цього винаходу. [Наприклад, Kaplan et al., описують кілька алелів c-Src курчат на їхній Фіг.1, включаючи Src A і Src251.

У цьому винаході описані дві категорії функції c-Src для модулювання ангіогенезу. Як було описано раніше, одна категорія містить молекулу Src, які посилюють ангіогенез і завдяки цьому вважаються активними білками. У цьому винаході продемонстровано, що натуральні Src разом з різноманітними мутаціями стимулюють ангіогенез.

Однією кращою мутацією натурального c-Src, яка функціонує в цьому контексті щодо його спроможності стимулювати зростання кровеносних судин і, таким чином, підвищує вагу пухлини *in vivo*, є мутант Src A, який має крапкову мутацію в положенні 527 амінокислотного залишку, яка змінює тирозин 527 на фенілаланін. Цей сайт є звичайно сайтом негативного регулювання кіназою c-Src, називаючись тут кіназою CSK. Коли CSK фосфорилує амінокислоту 527 у натуральному Src, білок інактивується. Проте у видозміненому Src A регулятивний тирозин перетворився на фенілаланін, таким чином, зробивши білок конститутивно (тобто постійно) активним білком, який не піддається інактивації фосфорилуванням.

Було також продемонстровано, що мутації Src мають протилежний модулюючий вплив на ангіогенез і інгібують ангіогенез замість його стимулювання. Такі мутації називаються неактивними мутаціями Src. Білки, які мають мутацію, що надає їм інгібуючу дію, також називаються домінуючими негативними Src-білками, оскільки вони інгібують неоваскуляризацію, як в результаті ендегенної активності Src, так і в результаті підвищеної активності Src внаслідок стимулювання фактора росту. Таким чином, певні мутації натурального c-Src згідно з цим винаходом також можуть діяти як домінуючі негативні білки щодо їхньої спроможності блокувати зростання кровеносних судин і, наприклад, внаслідок цього зменшувати вагу пухлини *in vivo*.

Такий найкращий інгібуючий білок c-Src включає Src 251, у якому лише перші 251 амінокислот Src піддаються експресії. У цій конструкції відсутній весь домен кінази, і тому її називають Src-білком "з мертвою кіназою". Друга конструкція є мутацією Src (K295M), у якій лізинний амінокислотний залишок 295 мутує в метіонін. Ця крапкова мутація в домені кінази запобігає зв'язуванню аденозинтрифосфату, а також блокує залежні від кінази функції Src, пов'язані з сигналізацією та проліферацією васкулярних клітин і клітин пухлини.

Наприклад, для мутації в залишку 527, якщо одержуваний в результаті залишок видозміненої амінокислоти не є тирозином, серином або треоніном, в цьому винаході передбачається, що результатом присутності альтернативної амінокислоти в необхідному положенні є утворення Src-білка з необхідною активною модулюючою дією, яка сприяє ангіогенезу.

Щодо крапкових мутацій будь-яка мутація, результатом якої є необхідна інгібуюча або стимулююча активність, розглядається для використання у цьому винаході. Також розглядаються конструкції злитих білків, які комбінують необхідний Src-білок (його мутацію або фрагмент) з експресованими кінцями амінокислот, антигенними детермінантами, флуоресцентним білком або будь-яким іншим білком або пептидами. якщо зберігається необхідний моделюючий вплив Src-білка.

Таблиця 1

Src/Мутація	Функція Src	Вплив на ангіогенез
-------------	-------------	---------------------

c-Src	+ активний	стимулює
SrcA (T527F)	+ активний	стимулює
Src 527 (крапковий)	+ активний	стимулює
Src 251	неактивний	інгібує
Src (зрізаний)	неактивний	інгібує
Src (K295M)	неактивний	інгібує
Src 295 (крапковий)	неактивний	інгібує

Однією кращою конструкцією експресії для використання в цьому винаході (конструкція ЗРВСП-ВР(А) (ідент. № посл.: 1). Цей вектор експресії заснований на ряді здатних до реплікації вірусів саркоми птахів з посиленою полімеразою Бріана (ПБ) для поліпшеного титру і є характерним для глікопротеїну оболонки типу А, експресованого на нормальні клітини птахів [розглянуто в "Методах клітинної біології", 52:179-214 (1997). див. також Hughes et al., 1987, J. Virol., 61:3004-3012; Fekete та Cepko, 1993, Mol. Cellulai Biol., 13(4):2604-2613; Itoh et al., 1996, Development, 122:291-300; та Stott et al., 1998, BioTechniques, 24:660-666]. Повна послідовність ЗРВСП-ВР(А) (ідент. № поел. 1) приведена в доданому переліку послідовностей, а рестрикційна карта конструкції зображена на Fig.10 і називається тут ЗРВСП.

Вихідна конструкція Src 251 була субклонована доктором Пем Шварцберг в Національному інституті охорони здоров'я в лабораторії доктора Херольда Вармуса. Якщо стисло, то клонування послідовності кДНК Src було здійснено шляхом вставки лінкера, який містить сайту рестрикції Not I-BstB1-Not I, у єдиний центр Not I у кінці 5' Src 251. Src має єдиний сайт Cla I у кінці 3'. Шляхом перетравлення Src 251 з BstB1 та Cla I був утворений фрагмент BstB1-Cla I, який був потім лігований у сайт Cla I на ЗРВСП-ВР(А). Виступ BstB1 уможливує лігування з виступом Cla I, який не можна вдруге відрізати Cla I. Конструкції Src, придатні для використання при реалізації цього винаходу, можна легко одержати у вищевказаному векторі спочатку шляхом перетравлення вектора ЗРВСП, який містить Src 251 з Not I та Cla I (у аденінметилазі ДНК + фон), щоб уможливити вставку перетравленої подібним чином кДНК Src. Отже, ця вихідна конструкція ЗРВСП-ВР(А), яка містить Src 251, далі використовувалася для субклонування всіх інших конструкцій Src, [як це було описано вище і у Kaplan et al., (1994, The EMBO J., 13(20):4745-4756)] у ЗРВСП-ВР(А) через фрагмент Not I-Cla I, утворений через конструкцію Src. Для одержання необхідних мутацій c-Src у кДНК були використані стандартні процедури сайт-специфічного мутагенезу, знайомі спеціалісту в цій галузі техніки з середнім рівнем знань. Праймери ЛРП, сконструйовані для введення необхідних мутацій, також були сконструйовані з сайтами рестрикції для полегшення наступних етапів клонування. Цілі сегменти кодуючих послідовностей нуклеїнової кислоти Src видаляють з конструкції нуклеїнової кислоти за допомогою технологій ампліфікації ЛРП, заснованих на відомих послідовностях кДНК курчат, людини та подібних гомологів Src і наступному утворенні нових конструкцій.

В одному варіанті реалізації цього винаходу праймер 3' ЛРП, використовуваний для ампліфікації нуклеїнових кислот Src, також кодує послідов-

ність у рамці. Використання цього праймера додає кінець антигенної детермінанти 9E10-тус до карбоксильного кінця наступної конструкції Src.

Наступні амінокислоти були додані після амінокислоти 251 Src для утворення векторних конструкцій, що містять кінець антигенної детермінанти 9E10-тус: VDMEQKLI AEEDLN (ідент. № посл.: 6). Для кожної конструкції були проведені дві окремі ЛРП, і були отримані подібні результати. Всі конструкції-мутанти, сконструйовані ЛРП, були також упорядковані ЛРП для закріплення прогнозованої послідовності ДІІК клонів. Натуральні та мutowані кДНК Src для використання в системах експресії згідно з цим винаходом також можна одержати в "Апстейт Байотек Лебораторіз" ("Upstate Biotech Laboratories"), Лейк Плесід, Нью-Йорк, яка продає Src птахів та людини і кілька мutowаних форм з мертвою кіназою та активованих форм.

Альтернативні вектори експресії для використання при експресії Src-білків згідно і цим винаходом також включають аденовірусні вектори, як це [описано в патентах США №№4,797,368, 5,173,414, 5,436,146, 5,589,377 та 5,670,488]. Альтернативні способи доставки модулюючих Src-білків включають доставку кДНК Src за допомогою невіру спої векторної системи, [описаної в патенті США №5,675,954], та доставку самої кДНК як депротейнізованої ДНК, [описану в патенті США №5,589,466]. Доставка конструкцій згідно з цим винаходом також не обмежується локальним застосуванням вірусного вектора, як описується для системи аналізу ХАМ нижче. Наприклад, препарати вірусних векторів також упорскують внутрішньовенним шляхом для систематичної доставки в русло судини. Ці вектори також можуть бути спрямовані на центри підвищеної неоваскуляризації шляхом локалізованої ін'єкції, наприклад, в пухлину.

Експресовані *in vitro* білки також розглядаються для їх доставки після експреси та очищення обраного Src-білка за допомогою способів, корисних для доставки білків або поліпептидів. Один з таких способів включає системи доставки ліпосом, наприклад, такі, які були [описані в патентах США №№4,356,167, 5,580,575, 5,542,935 та 5,643,599]. Інші системи доставки векторів та білків добре відомі спеціалістам у цій галузі техніки і середнім рівнем знань для використання для експресії та/або доставки Src-білків згідно і цим винаходом.

2. Характеризування необробленої хоріоалантоїсної мембрани (ХАМ) курчат

А. Приготування ХАМ

Ангіогенез може бути стимульований в хоріоалантоїсній мембрані (ХАМ) курчат після того, як внаслідок нормального зародкового ангиогенезу відбулося утворення зрілих кровоносних судин. Було продемонстровано, що ангиогенез може бути стимульований у відповідь на характерний цитокінез або фрагменти пухлини, як це [описано Leibovich et al., *Nature*, 329:630 (1987) та Ausprunk et al., *Am. J. Pathol.*, 79:594 (1975)]. ХАМ були приготовлені з ембріонів курчат для наступного індукування ангиогенезу та його інгібування. Десятиденні ембріони курчат були отримані з птахофабрики "Макінтайр" (Лейксайд, Каліфорнія), інкубувалися при 37°C та вологості 60%. У шка-

лупі з боку, прямо протилежного повітряному мішечку, був зроблений невеличкий отвір за допомогою невеличкого промислового свердла (фірми "Дремел", підрозділу компанії "Емерсон Електрик", Расін, Вайомінг). Другий отвір був просвердлений на широкій стороні яйця в ділянці, вільній від кровоносних судин ембріона, попередньо визначений просвічуванням. До першого отвору був прикладений негативний тиск, який призвів до відтягування ХАМ (хоріоалантоїсної мембрани) від мембрани шкаралупи та створення несправжньою повітряного мішечка над ХАМ. Було просвердлено квадратне вікно 1×1см у шкаралупі над опущеною ХАМ з використанням невеличкого модельного точильного кола (фірми "Дремел"). Це невеличке вікно дозволило здійснити безпосередній доступ до ХАМ, що лежить нижче.

Утворений в результаті препарат ХАМ був використаний або після 6 днів ембріогенезу, стадії, яка характеризується активною неоваскуляризацією, без додаткового оброблення ХАМ, як модель для оцінки впливу на ембріональну неоваскуляризацію, або після 10 днів ембріогенезу, коли ангиогенез припинився. Таким чином, останній препарат був використаний у цьому винаході для індукування відновленого ангиогенезу у відповідь на оброблення цитокіном або контакт з пухлиною, як описано нижче.

3. Аналіз ангиогенезу ХАМ

А. Ангиогенез, викликаний факторами росту

Було показано, що ангиогенез може бути викликаний цитокінами або факторами росту.

Ангиогенез був викликаний шляхом розміщення пластини фільтра Ватману 5×5мм (фільтрувальний папір Ватману №1), змоченої збалансованим соляним розчином Хенкса (ЗСРХ) ("ПБКО", Гренд Айленд, штат Нью-Йорк) або ЗСРХ, що містить 2 мікрограма/мілілітр (мкг/мл) рекомбінантного основного фактора росту фібробластів (оФРФ) або фактору росту судинного ендотелію (ФРСЕ) ("Гензім", Кембридж, штат Масачусетс) на ХАМ 9- або 10-денного ембріона курчати у ділянці, віддаленій від кровоносних судин, і наступного запечатування вікон стрічкою. Інші концентрації факторів росту також ефективні для індукування зростання кровоносних судин. У спостереженнях, у яких інгібування ангиогенезу оцінюється внутрішньовенним введенням антагоністів, ангиогенез спочатку індукується 1-2мкг/мл оФРФ або ФРСЕ у середовищі росту фібробластів. Ангиогенез спостерігали за допомогою фотомікроскопа через 72 годин

В. Ангиогенез ембріона

Препаратом ХАМ для оцінювання впливу інгібіторів ангиогенезу на природне утворення нових судин ембріона є 6-денний ембріон курчати, як було описано вище. На цій стадії розвитку кровоносні судини проходять зростання *de novo* і, таким чином, забезпечують корисну систему для оцінювання модулювання ангиогенезу Src-білками згідно з цим винаходом. Систему ХАМ готують так, як описано вище, з тим винятком, що аналіз здійснюють на 6-й день ембріонального розвитку, а не на 9-й або 10-й день.

4. Модулювання ангиогенезу, виміряне у дослідженні ХАМ

Для оцінювання впливу Src-білка на ангиогенез

були проведені наступні дослідження препаратів ХАМ 10-денного курчати. П'ять мкг конструкцій ЗРВСП. приготовлених так, як описано в Прикладі 1, були піддані трансфекції в іморталізовану лінію фібробластів курчат DF-1 (дарунок Дуга Фостера, Університет Мінесоти). Ця лінія клітин, а також первинні фібробласти ембріона курчати були спроможні до утворення вірусу, проте лінія клітин DF-1 утворила більші титри. Плаваючі на поверхні віруси були зняті зі злитих ліній клітин-продуцентів DF-1 у цитозольподібному середовищі, вільному від сироватки [склад: основне середовище F-10, доповнене диметилсульфоксидом, фолієвою кислотою, глутаміновою кислотою і MEM вітамінний розчин]. Тридцять п'ять мл суспензії вірусів були концентровані шляхом ультрацентрифугування при 4°C протягом 2 годин на швидкості 22000об./хв. Ці концентровані вірусні гранули були знову суспензовані в об'ємі 1/100 від початкового об'єму цитозольподібного середовища. вільного від сироватки, розділені на аліквоти та зберігалися при температурі -80°C. Титр був оцінений серійним розчиненням контрольного вірусного вектора, який має нуклеотидну послідовність, що кодує зелений флуоресцюючий білок (ЗФБ). який називається ЗРВСП-ЗФБ, зараження на первинних фібробластах ембріона курчати, що були інкубовані протягом 48-72 годин. Титри вірусних ліній, які були отримані після концентрації, регулярно перевищували 10⁸ міжнародних одиниць на мл. Для дослідження ХАМ з використанням вірусних ліній були підготовлені протягом 30 хвилин у 3мг/мл ацетату кортизону в 95% етанолу фільтрувальні пластини Ватману діаметром 6мм. змочені ацетатом кортизону. Пластини були висушені у витяжній шафі з ламінарним потоком, а потім вимочені протягом 10 хвилин у 20мл вірусної лінії на кожну пластину. Ці пластини були притиснуті до ХАМ 9- або 10-денних ембріонів курчат і запечатані целофановою стрічкою та інкубовані при 37°C протягом 18-24 годин. Потім у концентрації 5мкг/мл до ХАМ в об'ємі 20мкл відповідної вірусної лінії добавляли контрольний фосфатний буферний розчин (ФБР) або фактори росту як додаткову підтримку вірусу в тканині ХАМ. Після 72 годин ХАМ були зібрані та перевірені на предмет зміни ангіогенного показника, як визначено подвійним сліпим перерахуванням числа точок розгалуження в ХАМ, розташованій під пластиною. Для кіназних досліджень тканина, розташована під пластиною, була зібрана для радіоімунпреципітаційного аналізу (РІПА), гомогенізована на моторизованому млині та Src-імунопреципітовані з еквівалентної кількості всього білка та піддана кіназному дослідженню *in vitro* з використанням злитого білка кінази з фокальною адгезією та глутатіон-S-трансферази (КФА-Г-S-T) як субстрату. Для імунофлуоресцентного вивчення тканина ХАМ. яка знаходилася під пластинами, була заморожена в криоконсерванті ОСТ, розділена по 4ммк зафіксована в ацетоні протягом 1 хвилини, інкубована в 3% звичайній козячій сироватці протягом 1 години, після чого інкубована в первинному антифосфорильованому антитіпі ПРСК (позаклітинної регульованої сигналом кінази) кроля, як було описано вище [Elisei et al., J. Cell Biol., 140:1255-1263 (1998)], відмиті у ФБР (фосфатному

буферному розчині – прим. перекладача) та визначені за допомогою повторного флуоресцюючого антитіла.

А. Стимуляція ендогенного Src за допомогою оФРФ та ФРСЕ

Для оцінювання впливу факторів росту на активність Src у модулюванні анпогенезу були проведені такі дослідження. Були розкладені екстракти тканини ХАМ 10-денних курчат, які були піддані впливу оФРФ або ФРСЕ (2мкг/мл) протягом 2 годин. Ендогенний Src-білок був імунопреципітований з еквівалентної кількості загального білка та підданий імунокомплексному кіназному дослідженню *in vitro* з використанням злитого білка КФА-Г-S-T як субстрату, підданий електрофорезу та перенесений на нітроцелюлозу.

Результати дослідження приведені на Фіг.5, на якій очевидним є збільшення активності Src в збільшеній густині гелю, обробленого оФРФ або ФРСЕ у порівнянні з необробленими (контрольними) зразками, які вказували на базову активність Src-білка у дослідженні ХАМ. Оброблення і оФРФ, і ФРСЕ призводить до збільшення присутньої в ХАМ ендогенної активності Src-білка приблизно в два рази. Згадане вище кіназне дослідження більши також було проведено з використанням анти-Src антитіла як контролю вмісту еквівалента Src та імуноглобуліну.

В. Вплив ретровірусної генної експресії Src А на ангіогенез ХАМ курчат

Наступне дослідження було проведено для оцінювання впливу видозмінених Src-білків на ангіогенез в препараті ХАМ. Для цього дослідження ХАМ 9-денних курчат були піддані впливу ЗРВСП-Src А або ЗРВСП-ЗФБ, що експресують ретровіруси, або буфера протягом 72 годин після описаної вище процедури.

Результати цього дослідження приведені на Фіг.6А, у якому рівень ангіогенезу був визначений так, як було описано вище. Характерні мікрофото знімки (з чотириразовим збільшенням) були зроблені стереомікроскопом, як показано на Фіг.6В. Основна лінія активності ендогенного Src має ангіогенний показник приблизно 50. Навпаки, ХАМ. оброблені експресованим ретровірусним вектором ЗРВСП-Src А, який має крапкову мутацію у позиції 527 амінокислотного залишку від тирозину до фенілаланіну, що призвело до підвищення (індукування) ангіогенного показника ангіогенезу приблизно до 90. Підвищення ангіогенезу, викликаного Src-А, також можна бачити на фотографіях, показаних на Фіг.6В.

С. Ретровірусна експресія Src А активує судинне активоване мітогеном протеїнкінази (АМП) фосфорилування

Вплив Src А в порівнянні з фактором росту ФРСЕ та ФМА на судинне АМП фосфорилування також було оцінено після процедур дослідження, описаних вище у цьому описі. Екстракти тканин ХАМ 10-денного курчати, піддані впливу ВЗФР або ФМА (другий мітоген у порівнянні концентрації) протягом 30 хвилин, порівнювалися з екстрактами тканин, які зараджувалися ретровірусом, що експресує Src-А, протягом 48 годин. Потім Src був імунопреципітований з еквівалентної кількості загального екстракту білка та підданий імунокомпле-

ксному кіназному дослідженню *in vitro* з використанням злитого білка КФА-Г-S-T як субстрату, піддані електрофорезу та перенесені на нітроцелюлозу.

Результати цього дослідження приведені на Фіг.7А, де необроблені ХАМ (ВЛ) проявляли фосфорилування судинної АМР кінази за допомогою ендогенного Src основної лінії. І ФРСЕ, і ФМА призводять приблизно до дворазового збільшення у порівнянні з основною лінією. Навпаки, Src-A підвищував активність приблизно у від 5 до 10 разів у порівнянні з необробленими зразками.

Аліквоти вищезгаданих лізатів цілих тканин також були виміряні для ендогенного фосфорилування ПРСК шляхом імуноблотингу антифосфорилування ПРСК антитілом, як показано на Фіг.7В. Для цього оцінювання ХАМ 10-денних курчат інфікували контрольними ЗРВСП або ЗРВСП, які експресували Src А. Через два дні ХАМ препарували, піддали заморожуванню в ОСТ та розрізали на частини 4мм. Частини офарбили з використанням імунної мітки антифосфорилування антитілом ПРСК ("Нью Інглеш Байолабз"), промили та розпізнали за допомогою протикроплячого кон'югованого з ФІТЦ вторинного антитіла цапа. Флуоресцентні образи були зафіксовані камерою на охолоджуваних приборах з зарядовим зв'язком (фірми "Прінстон Інст."). На мікрофотознімках показана підвищена імунофлуоресценція препаратами, обробленими Src А, у порівнянні з контрольними препаратами.

Д. Вибіркові вимоги до активності Src під час ангіогенезу, викликаного ВФРЕК, а не оФРФ

Для оцінювання впливу модулюючої активності Src на стимульований фактором росту ангіогенез були зроблені такі аналізи. ХАМ дев'ятиденних курчат піддали впливу ретровірусного векторного препарату, який здійснював експресію домінуючої негативної мутації Src, називаної Src 251 або Src K295M, як було описано вище. Ретровіруси ЗРВСП-Src 251 або контрольні ЗРВСП-3ФБ або буферні ХАМ обробляли протягом 20 годин, а потім інкубували ще протягом 72 годин при наявності або відсутності оФРФ або ВФРЕК.

Рівень ангіогенезу, виміряний так, як було описано вище, показаний на Фіг.8А Репрезентативні мікрофотознімки (з шестиразовим збільшенням), показані на Фіг.8В. були зроблені за допомогою стереомікроскопа. На Фіг.8С показана пляма, зондована анти-Src антитілом для підтвердження експресії Src 251 у трансфекційованих клітинах у порівнянні з контрольним обробленням.

Результати аналізу, описаного вище, вказують на те, що як ХАМ, оброблені оФРФ. так і ХАМ, оброблені ФРСЕ при контрольних ЗРВСП-3ФБ стимулювали ангіогенез у порівнянні з викликанням Src базовим ангіогенезом, який спостерігався в контрольних або необроблених препаратах ХАМ. Експресований домінуючий негативний мутант Src 251 був ефективний при інгібуванні викликаного ФРСЕ ангіогенезу до базових рівнів, але не ефективний при інгібуванні ангіогенезу, викликаного оФРФ. Мікрофотознімки, показані на Фіг.8В, наочно підтверджують дані, показані на Фіг.8А. Таким чином, ретровірусно експресований Src 251 є ефективним інгібітором ангіогенезу, коли ангіогенез викликаний ФРСЕ.

У цьому винаході розглядаються застосування Src-білків згідно з цим винаходом в інших моделях ангіогенезу, описаних нижче у Прикладах.

5. Регресія зростання тканин пухлини модуляторами Src, виміряна шляхом аналізу моделі ока кролика *in vivo*

Вплив модуляторів Src на ангіогенез, стимульований фактором росту, можна спостерігати в природних прозорих структурах, прикладом яких є роговиця ока. Нові кровоносні судини ростуть від ободка роговиці, до якого йде велика притока крові, до центру роговиці, до якого звичайно притоки крові немає. Стимулятори ангіогенезу наприклад, оФРФ, при застосуванні до роговиці викликають зростання нових кровоносних судин від ободка роговиці. Антагоністи ангіогенезу при застосуванні до роговиці інгібують зростання нових кровоносних судин від ободка роговиці. Таким чином, у роговиці відбувається ангіогенез за допомогою прониикнення ендотеліальних клітин від ободка роговиці до жорсткої колагенової тканини роговиці, що можна добре бачити. Аналіз моделі ока кролика, отже, дає модель *in vivo* для прямого спостереження за стимулюванням та інгібуванням ангіогенезу після введення сполук безпосередньо до роговиці ока.

А. Аналіз моделі ока кролика *in vivo*

1) Ангіогенез, стимульований факторами росту

Ангіогенез стимулюється в аналізі моделі ока кролика *in vivo* факторами росту оФРФ або ФРСЕ та описується у наступних розділах.

а) Готування таблеток гідрону, що містять фактор росту та моноклонові антитіла

Таблетки полімеру гідрон, які містять фактор росту, готують так, як це було [описано D'Amato et al., Proc. Natl. Acad. Sci., США, 91:4082-4085 (1994)]. Окремі таблетки містять 650нг факторів росту, по окремі пов'язаних з сукральфатом (компанії "Марафет, Марион Меррелл Доу Корпорейшн") для стабілізації фактора росту та забезпечення його повільного звільнення до навколишньої тканини. Крім того, таблетки гідрону готують із вмістом необхідного ретровірусу, що експресує Src, як було описано вище. Таблетки відливають у спеціально виготовлених тефлонових стрижнях, які мають просвердлену в поверхні серцевину в 2,5мм. Приблизно 12мкл матеріалу для виливки поміщають у кожний стрижень і полімеризують протягом ночі в стерильному ковпаку. Потім таблетки стерилізують ультрафіолетовим випромінюванням. Вплив Src-білків потім оцінюють так, як це було описано вище.

6. Регресія *in vivo* зростання тканин пухлин модуляторами Src, виміряна шляхом аналізу химери миша/людина

Модель химерної миші/людини *in vivo* утворюють шляхом заміщення частини шкіри миші МТКІ (миші з тяжким комбінованим імунодефіцитом - прим, перекладача) крайньою плоттю новонароджених. Модель химерної миші/людини *in vivo* готують в основному так, як це [описано Yan et al., J. Clin. Invest., 91:986-996 (1993)]. Якщо описати це стисло, то у миші МТКІ (6-8-тижневого віку) видаляють хірургічним шляхом шматочок шкіри 2см² і заміщають його крайньою плоттю людини. Мишу знеболюють, і з кожної сторони бічної абдомінальної області на ділянці 5см² збивають шерсть. Два

круглих прошарки для прищеплювання розміром 2см² готують шляхом видалення шкіри на всю товщину аж до фасції. Шматочки шкіри для прищеплювання повної товщини такого ж розміру, отримані з крайньої плоти новонароджених, поміщають на місця ран і пришивають на це місце. Пересажену тканину накривають пов'язкою "Бенд-Ейд" ("Band-Aid"), яку пришивають до шкіри. На рану також накладають мікропористу тканинну стрічку.

Для утворення твердих пухлин людини на пересаженій мишам MTK1 людській шкірі використовують лінію клітин меланоми людини M21-L або лінію клітин раку грудей MDA 23.1 (Американська колекція типових культур, Банк пухлин людини, 26, $\alpha_M\beta_3$, негативні у відношенні імунореактивності частин тканин mAb LM609). Однократну клітинну суспензію 5×10^6 клітин M21-L або MDA 23.1 упорскують підшкірним шляхом у пересажену шкіру людини. Потім у мишей протягом 2-4 тижнів спостерігали зростання вимірних людських пухлин.

Після утворення вимірної пухлини у вену в хвості миші вводили ретровірусні препарати згідно з цим винаходом або ФБР. Через 2-3 тижні пухлину вирізали та проаналізували за вагою та гістологією. Потім оцінили вплив експресованих Src-білків згідно з цим винаходом на пухлини.

7. Регресія in vivo зростання тканин пухлин модуляторами Src, виміряна шляхом аналізу ХАМ

Зростання пухлини залежить від ангиогенезу [Folkman, 1992; Weidner et al., 1991; Brooks et al., 1994]. Дійсно, в останніх повідомленнях припускається, що зростання пухлини є чутливим до антиангіогенного впливу антагоністів рецептора ФРСЕ [Kim et al., 1993]. Отже, ми досліджували, чи впливатиме інгібування ангиогенезу шляхом доставки Src 251 з видаленою кіназою на зростання медулобластоми людини (DAOY), надангіогенної пухлини, яка, як відомо, утворює ФРСЕ і дуже малу кількість оФРФ (дані не приводяться).

3- та 6-денні аналізи зростання пухлини медулобластоми DAOY здійснювалися на ХАМ курчат в основному таким чином, як було описано вище [Brooks et al., 1994]. Клітини DAOY розміром 5×10^6 , культивовані в RPMI 1640, що містить 10% телячої ембріональної сироватки, промили та пересадили на ХАМ 10-денного ембріона для утворення фрагментів пухлини DAOY. Через 7 днів 50мг фрагментів пухлини розсікли і ще раз пересадили на інший 10-денний ембріон та інкубували протягом ще 3 або 6 днів з місцевим вживанням (25мкл) контрольного ретровірусу ЗРВСП-ЗФБ, ЗРВСП-Src 251 або контрольного лікування. Шляхом використання конфокальної візуалізації всієї тканини заражених пухлин як орієнтира ми змогли визначити, що відбулася значна експресія конструкцій ЗРВСП навколо та всередині фрагмента пухлини при цьому місцевому підході. Резекції і зважування пухлини здійснювали шляхом подвійного видалення наосліп тільки легко визначної маси твердої пухлини [Brooks et al., 1994]. Вологу вагу пухлин через 3 або 6 днів порівнювали з початковою вагою, і для кожної групи визначили процентну зміну ваги пухлини.

Ці пухлини легко зростали в ХАМ і давали активний ангиогенез (Фіг.9), що дозволило нам вибірково націлитися на судинну мережу пухлини птахів

шляхом використання ретровірусу ЗРВСП, характерного для птахів.

На Фіг.9 зображені результати, які вказують на те, що ретровірусна доставка ЗРВСП-Src 251 у людські пухлини, які зростають на ХАМ курчат, перетворює зростання пухлини на її регресію. На Фіг.9А показані медулобластоми людини, які були вирощені на ХАМ ембріонів курчат, як це було описано вище. Ретровірус, який містить ЗРВСП-ЗФБ або ЗРВСП-Src 251, місцево застосовували до попередньо утворених пухлин, вага яких не перевищувала 50мг. На репрезентативному мікрофотознімку фрагмента пухлини медулобластоми, інфікованого ЗРВСП-ЗФБ, що експресує ЗФБ, показана вся експресія в кровоносних судинах пухлин (розмірна стрілка), визначена шляхом оптичного пошарового аналізу конфокальним сканувальним лазерним мікроскопом "Bio Rad" ("Bio Rad") (смуга =500мкм). На Фіг.9В показані результати описаного вище лікування пухлин, яким дозволили зростати протягом 3 або 6 днів, після їхньої резекції та вимірювання вологої ваги. Дані виражені як середня зміна ваги пухлини (у порівнянні з початковою вагою пухлини 50мг) +/- СЗП 2 реплікатів. ЗРВСП-Src 251 мав значний вплив на зростання пухлини через 3 дні (*, $P < 0,002$) та 6 днів (**, $P < 0,05$). На Фіг.9С показані репрезентативні стереомікрофотознімки пухлин медулобластоми, видалених хірургічним шляхом з ембріонів, які були зроблені за допомогою стереомікроскопа "Олімпус" (смуга 350мкм) (нижня панель). На мікрофотознімку кожної пухлини з великим збільшенням докладно показана судинна мережа кожної пухлини (смуга =350мкм). Розмірна стрілка вказує на розрив кровоносних судин в оброблених ЗРВСП-Src251 пухлинах.

Результати показують, що наслідком доставки ЗРВСП, що містить Src 251, до попередньо утворених медулобластом стала вибіркова вірусна експресія в пов'язаних 5 пухлиною кровоносних судинах (Фіг.9А), що в остаточному підсумку призвело до регресії цих пухлин протягом шести днів (Фіг.9В). Що важливо, пов'язані з пухлинами кровоносні судини у тварин, оброблених вірусом, який містить Src 251, були сильно порвані, і їх було менше в порівнянні з судинами пухлини в контрольних тварин (Фіг.9С) Той факт, що інфіковані ЗРВСП-Src 251 пухлини продемонстрували локалізацію ЗФБ тільки в судинній мережі пухлини, наводить на думку про те, що антипухлинний вплив, який спостерігався при ретровірусній доставці Src 251, був викликаний його антиангіогенними властивостями.

Вищенаведені приклади та доданий опис є ілюстративними і не повинні тлумачитися як обмежувальні. Цей винахід не слід обмежувати за його масштабами викладеними лініями клітин, оскільки викладений варіант реалізації, як передбачається, є однією з ілюстрацій одного з аспектів винаходу. Будь-яка лінія клітин, яка є функціонально еквівалентною, не виходить за рамки винаходу. Виклад матеріалу не допускає припущення про те, що письмовий опис, приведений тут, є неадекватним для того, щоб уможливити реалізацію якогось з аспектів винаходу, включаючи найкращий режим його реалізації, і його не слід тлумачи-

ти як такий, що обмежує масштаби формній винаходу конкретно ілюстрацією, наданою у ній. Насправді різноманітні модифікації цього винаходу, крім тих, що були показані та описані тут, будуть

очевидними для спеціалістів у цій галузі з вищеведеного опису і не виходитимуть за рамки додаткової формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> "Зе Скріпс Рісьорч Інстітют" та ін.

<120> Способи та сполуки для модулювання ангиогенезу з використанням тирозинкінази

<130> TSRI 651.1

<140> Ще не відомо

<141> Буде визначено

<150> 60/087,220

<151> 1998-05-29

<160> 6

<170> PatentIn версія 2.0

<210> 1

<211> 11627

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: ЗРВСП-ВР(А), заснований на вірусі саркоми птахів

<220>

<221> зміш_риса

<222> (7649)...(11258)

<223> послідовності pBR322

<220>

<221> LTR-послідовність

<222> (7166)...(7494)

<223> вище

<220>

<221> LTR-послідовність

<222> (1)...(101)

<223> вище (нумерація починається вище R)

<220>

<221> зміш_риса

<222> (11394)...(11623)

<223> U3

<220>

<221> зміш_риса

<222> (1)...(21)

<223> R

<220>

<221> зміш_риса

<222> (22)...(101)

<223> U5

<220>

<221> зміш_риса

<222> (102)...(119)

<220>

<221> LTR-послідовність

<222> (7166) ... (7494)
<223> нижче

<220>
<221> зміш_риса
<222> (7166) ... (7393)
<223> U3

<220>
<221> зміш_риса
<222> (7394) ... (7414)
<223> R

<220>
<221> зміш_риса
<222> (7415) ... (7494)
<223> U5

<220>
<221> зміш_риса
<222> (7154) ... (7165)
<223> PPT

<220>
<221> зміш_риса
<222> (388) ... (391)
<223> донор сплайсінгу (AGGT)

<220>
<221> зміш_риса
<222> (5074) ... (5077)
<223> акцептор сплайсінгу env (AGGC)

<220>
<221> зміш_риса
<222> (6982) ... (6985)
<223> акцептор сплайсінгу ClaI (AGGA)

<220>
<221> ген
<222> (372) ... (902)
<223> gag p19

<220>
<221> ген
<222> (909) ... (1094)
<223> gag p10

<220>
<221> ген
<222> (1095) ... (1814)
<223> gag p27

<220>
<221> ген
<222> (1843) ... (2108)
<223> gag p12

<220>
<221> ген
<222> (2109) ... (2480)
<223> gag p15

<220>
<221> зміш_сигнал
<222> (2481) ... (2483)
<223> зупинка gag

<220>
<221> ген
<222> (2501) ... (4216)
<223> pol RT

<220>
<221> ген
<222> (4217) ... (5185)
<223> pol IN

<220>
<221> зміш_сигнал
<222> (5186) ... (5188)
<223> зупинка pol

<220>
<221> ген
<222> (5244) ... (6263)
<223> env gp85

<220>
<221> ген
<222> (6264) ... (6878)
<223> env gp37

<220>
<221> зміш_сигнал
<222> (6879) ... (6881)
<223> зупинка env

<220>
<221> зміш_риса
<222> (7027)
<223> сайт ClaI / сайт ClaI в gag метилований у штаммах Dam⁺ і не ділиться

<400> 1

gccatttgac cattcaccac attggtgtgc acctgggttg atggccggac cgttgattcc 60
ctgacgacta cgagcacctg catgaagcag aaggcttcat ttggtgaccc cgacgtgata 120
gttagggaat agtgggtcgc cacagacggc gtggcgatcc tgtctccatc cgtctcgtct 180
atcgggagggc gagtctgatg accctgggtg agggggctgc ggcttaggga ggcagagctc 240
gagtaccgtc ggaggagctc ccagggcccg gagcgactga cccctgccga gaactcagag 300
ggctcgtcga agacggagag tgagcccgac gaccacccca ggcacgtctt tggtcggcct 360
gcggatcaag catggaagcc gtcattaagg tgatttcgtc cgcgtgtaaa acctattgcg 420
ggaaaaatctc tccttctaag aaggaaatcg gggccatggt gtcctgttta caaaaggaag 480
ggttgcttat gtcctcccca gatttatatt ctccgggggc cgggatccc atcactgcgg 540
cgctctccca gcgggcaatg gtacttgga aatcggggaga gttaaaaacc tggggattgg 600
ttttgggggc attgaaggcg gctcgagagc aacagggttac atctgagcaa gcaagtttt 660
ggttgggatt agggggaggg aggggtctct cccagggtcc ggagtgcac gagaaaccag 720
ctacggagcg gcaatcgcac aaaggggagg aggtgggaga aacaactctg cagcgagatg 780
cgaagatggc gccagaggaa gcggccacac ctaaaaccgt tggcacatcc tgcctatcatt 840
gcggaacagc tgttggtcgc aattgcgcca ccggccacag ctcggccccc cctccccctt 900
atgtggggag tggttgttat ccttcctctg cgggggtggg agagcagcag gccaggggag 960
ataaacagtc tcggggggcg gagcagccaa gggaggagcc agggcacgag ggtcaggccc 1020
ctgggccggc cctgactgac tgggcaaggg taaggaggga gcttgcgagt actggtccgc 1080
ccgtggtggc catgcctgta gtgattaaga cagagggacc cgcttgacc cctctggagc 1140
caaaattgat cacaagactg gctgatacgg tcaggaccaa gggcttacga tccccgatca 1200
ctatggcaga agtggagcgc ctcatgtcct ccccggtgct gccgcatgac gtcacgaatc 1260
taatgagagt gattttagga cctgccccat atgccttatg gatggacgct tggggagctc 1320
aactccagac ggttatagcg gcagccactc gcgacccccc acaccagcg aacggtcaag 1380
ggcgggggga acggactaac ttggatcgat taaagggtct agctgatggg atgggtggga 1440
accacagggc tcaggccgca ttattaagac cggggggaatt ggttgctatt acggcgtcgg 1500
ctctccagcg gtttagagaa gttgcccggc tggcggaacc tgcaggtcca tggcgggaca 1560
tcacgcaggg accatctgag tccttgtgtg attttgccaa tcggcttata aaggcggttg 1620
aggggtcaga tctcccgccc tccgcgcggg ctccggtgat cattgactgc tttaggcaga 1680
agtcacagcc agatattcag cagcttatac gggcagcacc ctccacgctg accaccccag 1740
gagagataat caaatatctg ctgacagcgc agaagattgc ccctcttacg gatcaaggca 1800
tagccggcgc catgtcgtct gctatccagc ccttagttat ggcagtagtc aatagagaga 1860
gggatggaca aactgggtcg ggtggtcgtg cccgagggct ctgctacact tgtggatccc 1920
cgggacatta tcaggccacg tgcccgaaaa aacgaaagtc aggaacacgc cgtgagcgat 1980
gtcagctctg tgacgggatg ggacacaacg ctaaacagtg taggaagcgg gatggcaacc 2040
agggccaacg cccaggaaga ggtctctctt cggggcccggt gcccgccctt gagcagcctg 2100
ccgtctcgtt agcgatgaca atggaacata aagatcgccc cttggttagg gtcattctga 2160
ctaactcagg gactcatcca gtcaacaac gttcgggtga tatcacccgc ctgttggact 2220
ccggagcgga catcactatt atttcggagg aggattggcc tactgattgg ccggtggtgg 2280
acaccgcgaa cccaagatc catggcatag gagggggaat tccatgcga aaatcccggg 2340
atátgataga ggtgggggtt attaacagag acgggtcgtt ggagcgaccc ctgctcctct 2400
tcccccaqt cgtatcggtt agaggagta tcctaggaag agattgtctg cagggcctag 2460

41	75565	42	
ggctccgctt	gacaaattta	tagggagggc	cactgttctc actgttgccg tacatctggc 2520
tattccgctc	aaatggaagc	cagaccgcac	gcctgtgtgg attgaccagt ggccccctcc 2580
tgaaggtaaa	cttgtaggcc	taacgcaatt	agtggaaaaa gaattacagt taggacatat 2640
agagccctca	cttagttgtt	ggaacacacc	tgtttttcgt gatccggaag gcttccgggt 2700
cttatcgctt	attgcatgat	ttgcgcgctg	ttaacgccaa gcttgtccct tttggggccg 2760
tccaacaggg	ggcgccagtt	ctctccgcgc	tcccgcgtgg ctggccccctg atggctctag 2820
acctcaagga	ttgcttcttt	tctatccctc	ttgcggaaca agatcgcgaa gcttttgcat 2880
ttacgctccc	ctctgtgaat	aaccaggccc	ccgctcgaag attccaatgg aaggctcttg 2940
cccaagggat	gacctgttct	cccactatct	gtcagttggg agtgggtcag gtgctcgagc 3000
ccttgcgact	caagcaccca	gctctgcgca	tgttgcatta tatggacgat cttttgctag 3060
ccgcctcaag	tcatgatggg	ttggaagcgg	cagggaaagga gggtatcggg acattggaaa 3120
gagccgggtt	cactatttcg	ccggataaga	tccagagggga gcccgagta caatatcttg 3180
ggtacaagtt	aggcagtacg	tatgtagcac	ccgtaggctt ggtagcagaa cccaggatag 3240
ccacctgtg	ggatgttcaa	aagctgggtg	ggtcacttca gtggcttcgc ccagegttag 3300
ggatcccgcc	acgactgatg	ggtccttttt	atgagcagtt acgagggcca gacctaaccg 3360
aggcgaggga	atggaatcta	gacatgaaaa	tggcctggag agagatcgta cagcttagca 3420
ctactgctgc	cttggaaacga	tgggaccctg	cccagcctct ggaaggagcg gtcgctagat 3480
gtgaacaggg	ggcaataggg	gtcctgggac	agggaactgtc cacacacca aggccatgtt 3540
tgtggttatt	ctccacccaa	cccaccaagg	cgttttactgc ttgggttagaa gtgctcacc 3600
ttttgattac	taagctaagc	gcttcggcag	tgcgaacctt tggcaaggag gttgatatcc 3660
tcctgttgcc	tgcattgctt	cgggaggacc	ttccgctccc ggaggggata ctgttagcac 3720
ttaggggggt	tgcaggaaaa	atcaggagta	gtgacacgcc atctattttt gacattgcgc 3780
gtccactgca	tgtttctctg	aaagtgaggg	ttaccgacca ccctgtgccg ggacccactg 3840
tctttaccga	cgcctctca	agcaccata	aaggggtggg agtctggagg gagggcccaa 3900
gggtgggagat	aaaagaaata	gttgatttgg	gggcaagtgt acaacaactg gaggcacgcg 3960
ctgtggccat	ggcacttctg	ctgtggccga	caacgcccac taatgtagt actgactctg 4020
cgtttgttgc	gaaaatgtta	ctcaagatgg	gacaggaggg agtcccgtct acagcggcgg 4080
cttttatttt	agaggatgcg	ttaagccaaa	ggtcagccat ggccgccgtt ctccacgtgc 4140
ggagtcattc	tgaagtgcc	gggtttttca	cagaaggaaa tgacgtggca gatagccaag 4200
ccacctttca	agcgtatccc	ttgagagagg	ctaaagatct tcataccgct ctccatattg 4260
gaccccgccg	gctatccaaa	gcgtgtaata	tatctatgca gcaggctagg gaggttggtc 4320
agacctgccc	gcattgtaat	tcagcccctg	cgttggaggc cggggtaaac cctaggggtt 4380
tgggaccct	acagatatgg	cagacagact	ttacgcttga gcctagaatg gctccccgtt 4440
cctggctcgc	tgttactgtg	gacaccgcct	catcagcgat agtcgtaact cagcatggcc 4500
gtgttacatc	ggttgctgca	caacatcatt	gggccacggc tatcgccgtt ttgggaagac 4560

caaaggccat aaaaacagat aacgggtcct gcttcacgtc cagatccacg cgagagtggc 4620
 tcgcgagatg ggggatagca cacaccaccg ggattccggg aaattcccag ggtcaagcta 4680
 tggtagagcg ggccaaccgg ctectgaaag ataagatccg tgtgctcgcg gagggggacg 4740
 gctttatgaa aagaatcccc accagcaaac agggggaact attagccaag gcaatgtatg 4800
 ccctcaatca ctttgagcgt ggtgaaaaca caaaaacacc gatacaaaaa cactggagac 4860
 ctaccgttct tacagaagga cccccggtta aaatacgaat agagacaggg gagtgggaaa 4920
 aaggatggaa cgtgctggtc tggggacgag gttatgccgc tgtgaaaaac agggacactg 4980
 ataaggttat ttgggtaccc tctcggaag ttaaaccgga tgtcacccaa aaggatgagg 5040
 tgactaagaa agatgaggcg agccctcttt ttgcaggcat ttctgactgg ataccctggg 5100
 aagacgagca agaaggactc caaggagaaa ccgctagcaa caagcaagaa agaccctggg 5160
 aagacaccct tgctgccaac gagagttaat tatattctca ttattggtgt cctgggtctg 5220
 tgtgaggtta cgggggtaag agctgatgtc cacttactcg agcagccagg gaacctttgg 5280
 attacatggg ccaaccgtac aggccaaacg gatttttggc tctctacaca gtcagccacc 5340
 tccccctttc aaacatgttt gataggtatc ccgtccccta tttccgaggg tgattttaag 5400
 ggatatgttt ctgatacaaa ttgcaccacc ttgggaactg atcggttagt ctcgctcagc 5460
 gactttactg gcggacctga caacagtacc accctcactt atcggaaggc ctcatgcttg 5520
 ttgttaaagc tgaatgtctc tatgtgggat gagccacctg aactacagct gttagggttc 5580
 cagtctctcc ctaacattac taatattgct cagatttccg gtataaccgg gggatgcgta 5640
 ggcttcagac cacaaggggt tccttggtat ctaggttggc ctagacagga ggccacgcg 5700
 tttctcctta gacaccctc tttctctaaa tccacggaac cgtttacagt ggtgacagc 5760
 gataggcaca atctttttat ggggagtgag tactgcggtg catatggcta cagattttgg 5820
 aacatgtata actgctcaca ggtggggcgg cagtaccgct gtggtaatgc gcgcacgccc 5880
 cgcacgggtc ttectgaaat ccagtgtaca aggagaggag gcaaatgggt taatcaatca 5940
 caggaaatta atgagtcgga gccgttcagc tttacggtga actgtacagc tagtagtttg 6000
 ggtaatgcca gtgggtgttg cggaaaagca ggcacgattc tcccgggaaa gtgggtcgac 6060
 agcacacaag gtagtttcac caaaccaaaa gcgctaccac ccgcaatttt cctcatttgt 6120
 ggggatcgcg catggcaagg aattcccagt cgtccggtag ggggcccctg ctatttaggc 6180
 aagcttacca tgtagcacc taagcataca gatattctca aggtgcttgt caattcatcg 6240
 cggacaggta taagacgtaa acgaagcacc tcacacctgg atgatacatg ctcatgtaa 6300
 gtgcagcttt ggggtcctac agcaagaatc tttgcatcta tcctagcccc gggggtagca 6360
 gctgcgcaag ccttaagaga aattgagaga ctagcctgtt ggtccgttaa acaggctaac 6420
 ttgacaacat cactcctcgg ggacttattg gatgatgtca cgagtattcg acacgcggtc 6480

45	75565	46	
ctgcagaacc	gagcggctat	tgacttccttg	ctcctagctc acggccatgg ctgtgaggac 6540
gttgccggaa	tgtgctgttt	caatttgagt	gatcagagtg agtctataca gaagaagttc 6600
cagctaataga	aggaacatgt	caataagatc	ggcgtggata gcgacctaat tggaaagtgg 6660
ctgcgaggac	tattcggggg	aataggagaa	tgggccgttc atttgctgaa aggactgctt 6720
ttggggccttg	tagttatttt	gttgctagta	gtgtgcctgc cttgcctttt gcaaatgtta 6780
tgcggttaata	ggagaaagat	gattaataac	tccatcagct accacacgga atataagaag 6840
ctgcaaaagg	cctgtgggca	gcctgaaagc	agaatagtat aaggcagtac atgggtgggtg 6900
gtatagcgct	tgcgagtcca	tcgagcaagg	caggaaagac agctattggg aattgtgaaa 6960
tacgcttttg	tctgtgtgct	gcaggagctg	agctgactct gctggtggcc tcgcgtacca 7020
ctgtggcatc	gatgcgatgt	acgggccaga	tatacgcgta tctgagggga ctagggtgtg 7080
tttaggcgaa	aagcggggct	tcggttgtag	gcggttagga gtcccccttag gatatagtag 7140
tttcgctttt	gcatagggag	ggggaaatgt	agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca 7200
acatggtaac	gatgagttag	caacatgcct	tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc 7260
gattggtgga	agtaaggtgg	tacgatcgct	ccttattagg aaggcaacag acgggtctga 7320
catggattgg	acgaaccact	gaattccgca	ttgcagagat attgtattta agtgccctagc 7380
tcgatacaat	aaacgccatt	tgaccattca	ccacattggg gtgcacctgg gttgatggcc 7440
ggaccgttga	ttccctgacg	actacgagca	cctgcatgaa gcagaaggct tcatttggtg 7500
accccgacgt	gatagttagg	gaatagtggg	cggccacaga cggcgtggcg atcctgtctc 7560
catccgtctc	gtctatcggg	aggcgacttc	gatgaccctg gtggaggggg ctgcggctta 7620
gggaggcaga	agctgagtac	cgtcggaggg	gatccacagg acgggtgtgg tcgccatgat 7680
cgcgtagtgc	atagtggctc	caagtagcga	agcgagcagg actgggcggc ggccaaagcg 7740
gtcggacagt	gctccgagaa	cgggtgcgca	tagaaattgc atcaacgcat atagcgctag 7800
cagcacgcca	tagtgactgg	cgatgctgtc	ggaatggacg atatcccgca agaggcccg 7860
cagtaccggc	ataaccaagc	ctatgcctac	agcatccagg gtgacgggtg cgaggatgac 7920
gatgagcgca	ttgttagatt	tcatacacgg	tgcttgactg cgttagcaat ttaactgtga 7980
taaactaccg	cattaaagct	ccaaacttgg	ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 8040
acaattccac	acattatacg	agccggaagc	ataaagtgtg aaacctgggg tgcctaataga 8100
gtgagaattc	ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgctt atttttatag gttaatgtca 8160
tgataataat	ggtttcttag	acgtcaggtg	gcacttttgc gggaaatgtg cgcggaaccc 8220
ctatttgctt	atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc gctcatgaga caataaccct 8280
gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg 8340
cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgce	ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg 8400

47

75565

48

tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc 8460
 tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgttttcca atgatgagca 8520
 cttttaaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccggtg tgacgcggg caagagcaac 8580
 tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa 8640
 agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg 8700
 ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt 8760
 ttttgacaaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg 8820
 aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc agcaatggca acaacgttgc 8880
 gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga 8940
 tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgtcggc ccttccggct ggctggttta 9000
 ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc 9060
 cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg 9120
 atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt 9180
 cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa 9240
 ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt 9300
 cgttccactg agcgtcagac ccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt 9360
 ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt 9420
 tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga 9480
 taccaaatac tgtccttcta gtgtagcgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag 9540
 caccgcctac atacctcgt ctgctaacc tggtaccagt ggctgctgcc agtggcgata 9600
 agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg 9660
 gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcgc aacgacctac accgaactga 9720
 gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca 9780
 ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa 9840
 acgectggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt 9900
 tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac 9960
 ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc acatgttctt tectgcgtta tcccctgatt 10020
 ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga 10080
 ccgagcgcag cgagtcagt agcgaggaag cggaagagcg cctgatgcgg tattttctcc 10140
 ttacgcctct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 10200
 atgcgcata gttaagccag tatacactcc gctatcgtca cgtgactggg tcatggctgc 10260
 gcccgcacac ccgccaacac ccgtgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc 10320

49

75565

50

```

cgcttacaga caagctgtga ccgctctccg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc 10380
atcacccgaaa cgcgcgaggc agctgcggta aagctcatca gcgtggtcgt gaagcgattc 10440
acagatgtct gectgttcat cgcggtccag ctcggtgagt ttctccagaa gcgttaatgt 10500
ctggcttctg ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tcctgtttgg tcaactgatg 10560
cctccgtgta agggggaatt tctgttcatg ggggtaatga taccgatgaa acgagagagg 10620
atgctcacga tacgggttac tgatgatgaa catgcccggg tactggaacg ttgtgagggt 10680
aaacaactgg cggatatggat ggcgcgggac cagagaaaaa tcaactcaggg tcaatgccag 10740
cgcttcgtta atacagatgt aggtgttcca cagggtagcc agcagcatcc tgcgatgcag 10800
atccggaaca taatgggtgca ggcgcgtgac ttccgcgttt ccagacttta cgaaacacgg 10860
aaaccgaaga ccattcatgt tgttgctcag gtcgcagacg ttttgacgca gcagtcgctt 10920
cacgttcgct cgcgtatcgg tgattcattc tgctaaccag taaggcaacc ccgccagcct 10980
agccgggtcc tcaacgacag gagcacgac atgagcacc gtggccagga cccaacgctg 11040
cccgagatgc gccgcgtgcg gctgctggag atggcggacg cgatggatat gttctgccaa 11100
gggttggttt gcgcattcac agttctccgc aagaattgat tggctccaat tcttgagtg 11160
gtgaatecgt tagcgaggtg ccgccggctt ccattcaggt cgaggtggcc cggctccatg 11220
caccgcgacg caacgcgggg aggcagacaa ggtatagggc ggcgatgcga tgtacgggcc 11280
agatatacgc gtatctgagg ggactagggt gtgtttaggc gaaaagcggg gcttcggttg 11340
tacgcggtta ggagtccect taggatatag tagtttcgct tttgcatagg gagggggaaa 11400
tgtagtctta tgcaatactc ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt tagcaacatg 11460
ccttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt ggaagtaagg tggtagcatc 11520
gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat tggacgaacc actgaattcc 11580
gcattgcaga gatattgtat ttaagtgcct agctcgatac aataaac 11627

```

<210> 2

<211> 1759

<212> ДНК

<213> Курча

<220>

<221> ген

<222> (1) ... (1759)

<223> кДНК c-Src курчати

<220>

<221> CDS

<222> (112) ... (1710)

<400> 2

```

tctgacaccc atctgtctgt ctgtctgtgt gctgcaggag ctgagctgac tctgctgtgg 60

```

```

cctcgcgtac cactgtggcc aggcggtagc tgggacgtgc agcccaccac c atg ggg 117

```

51

75565

52

Met Gly
1

agc agc aag agc aag ccc aag gac ccc agc cag cgc cgg cgc agc ctg	165
Ser Ser Lys ₅ Ser Lys Pro Lys Asp ₁₀ Pro Ser Gln Arg Arg ₁₅ Arg Ser Leu	
gag cca ccc gac agc acc cac cac ggg gga ttc cca gcc tcg cag acc	213
Glu Pro Pro Asp Ser Thr His ₂₅ His Gly Gly Phe Pro ₃₀ Ala Ser Gln Thr	
ccc aac aag aca gca gcc ccc gac acg cac cgc acc ccc agc cgc tcc	261
Pro Asn Lys Thr Ala ₄₀ Ala Pro Asp Thr His Arg Thr Pro Ser Arg Ser ₅₀	
ttt ggg acc gtg gcc acc gag ccc aag ctc ttc ggg ggc ttc aac act	309
Phe Gly Thr Val Thr ₅₅ Glu Pro Lys ₆₀ Leu Phe Gly Gly Phe Asn Thr ₆₅	
tct gac acc gtt acg tcg ccg cag cgt gcc ggg gca ctg gct ggc ggc	357
Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg ₇₅ Ala Gly Ala Leu ₈₀ Ala Gly Gly	
gtc acc act ttc gtg gct ctc tac gac tac gag tcc cgg act gaa acg	405
Val Thr Thr ₈₅ Phe Val Ala Leu Tyr ₉₀ Asp Tyr Glu Ser Arg Thr Glu Thr	
gac ttg tcc ttc aag aaa gga gaa cgc ctg cag att gtc aac aac acg	453
Asp Leu Ser Phe Lys Lys ₁₀₅ Glu Arg Leu Gln ₁₁₀ Ile Val Asn Asn Thr	
gaa ggt gac tgg tgg ctg gct cat tcc ctc act aca gga cag acg ggc	501
Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Thr ₁₂₅ Thr Gly Gln Thr Gly ₁₃₀	
tac atc ccc agt aac tat gtc gcg ccc tca gac tcc atc cag gct gaa	549
Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp Ser Ile Gln Ala Glu ₁₄₅	
gag tgg tac ttt ggg aag atc act cgt cgg gag tcc gag cgg ctg ctg	597
Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg Leu Leu ₁₆₀	
ctc aac ccc gaa aac ccc cgg gga acc ttc ttg gtc cgg gag agc gag	645
Leu Asn Pro ₁₆₅ Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu ₁₇₅	
acg aca aaa ggt gcc tat tgc ctc tcc gtt tct gac ttt gac aac gcc	693
Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp Asn Ala ₁₈₀	
aag ggg ctc aat gtg aag cac tac aag atc cgc aag ctg gac agc ggc	741
Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp Ser Gly ₂₁₀	
ggc ttc tac atc acc tca cgc aca cag ttc agc agc ctg cag cag ctg	789
Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln Gln Leu ₂₂₅	
gtg gcc tac tac tcc aaa cat gct gat ggc ttg tgc cac cgc ctg acc	837
Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg Leu Thr ₂₃₀	
aac gtc tgc ccc acg tcc aag ccc cag acc cag gga ctc gcc aag gac	885

53							75565							54				
Asn	Val	Cys	Pro	Thr	Ser	Lys	Pro	Gln	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Lys	Asp			
245							250							255				
gcg	tgg	gaa	atc	ccc	cgg	gag	tcg	ctg	cgg	ctg	gag	gtg	aag	ctg	ggg	933		
Ala	Trp	Glu	Ile	Pro	Arg	Glu	Ser	Leu	Arg	Leu	Glu	Val	Lys	Leu	Gly			
260							265							270				
cag	ggc	tgc	ttt	gga	gag	gtc	tgg	atg	ggg	acc	tgg	aac	ggc	acc	acc	981		
Gln	Gly	Cys	Phe	Gly	Glu	Val	Trp	Met	Gly	Thr	Trp	Asn	Gly	Thr	Thr			
275							280							285				
aga	gtg	gcc	ata	aag	act	ctg	aag	ccc	ggc	acc	atg	tcc	ccg	gag	gcc	1029		
Arg	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Pro	Gly	Thr	Met	Ser	Pro	Glu	Ala			
295							300							305				
ttc	ctg	cag	gaa	gcc	caa	gtg	atg	aag	aag	ctc	cgg	cat	gag	aag	ctg	1077		
Phe	Leu	Gln	Glu	Ala	Gln	Val	Met	Lys	Lys	Leu	Arg	His	Glu	Lys	Leu			
310							315							320				
gtt	cag	ctg	tac	gca	gtg	gtg	tcg	gaa	gag	ccc	atc	tac	atc	gtc	act	1125		
Val	Gln	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Ser	Glu	Glu	Pro	Ile	Tyr	Ile	Val	Thr			
325							330							335				
gag	tac	atg	agc	aag	ggg	agc	ctc	ctg	gat	ttc	ctg	aag	gga	gag	atg	1173		
Glu	Tyr	Met	Ser	Lys	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Gly	Glu	Met			
340							345							350				
ggc	aag	tac	ctg	cgg	ctg	cca	cag	ctc	gtc	gat	atg	gct	gct	cag	att	1221		
Gly	Lys	Tyr	Leu	Arg	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Asp	Met	Ala	Ala	Gln	Ile			
355							360							365				
gca	tcc	ggc	atg	gcc	tat	gtg	gag	agg	atg	aac	tac	gtg	cac	cga	gac	1269		
Ala	Ser	Gly	Met	Ala	Tyr	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Tyr	Val	His	Arg	Asp			
375							380							385				
ctg	cgg	gcg	gcc	aac	atc	ctg	gtg	ggg	gag	aac	ctg	gtg	tgc	aag	gtg	1317		
Leu	Arg	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Val	Gly	Glu	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val			
390							395							400				
gct	gac	ttt	ggg	ctg	gca	cgc	ctc	atc	gag	gac	aac	gag	tac	aca	gca	1365		
Ala	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Ile	Glu	Asp	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ala			
405							410							415				
cgg	caa	ggt	gcc	aag	ttc	ccc	atc	aag	tgg	aca	gcc	ccc	gag	gca	gcc	1413		
Arg	Gln	Gly	Ala	Lys	Phe	Pro	Ile	Lys	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala			
420							425							430				
ctc	tat	ggc	cgg	ttc	acc	atc	aag	tcg	gat	gtc	tgg	tcc	ttc	ggc	atc	1461		
Leu	Tyr	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Ile			
435							440							445				
ctg	ctg	act	gag	ctg	acc	acc	aag	ggc	cgg	gtg	cca	tac	cca	ggg	atg	1509		
Leu	Leu	Thr	Glu	Leu	Thr	Thr	Lys	Gly	Arg	Val	Pro	Tyr	Pro	Gly	Met			
455							460							465				
gtc	aac	agg	gag	gtg	ctg	gac	cag	gtg	gag	agg	ggc	tac	cgc	atg	ccc	1557		
Val	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Asp	Gln	Val	Glu	Arg	Gly	Tyr	Arg	Met	Pro			
470							475							480				
tgc	ccg	ccc	gag	tgc	ccc	gag	tcg	ctg	cat	gac	ctc	atg	tgc	cag	tgc	1605		
Cys	Pro	Pro	Glu	Cys	Pro	Glu	Ser	Leu	His	Asp	Leu	Met	Cys	Gln	Cys			
485							490							495				
tgg	cgg	agg	gac	cct	gag	gag	cgg	ccc	act	ttt	gag	tac	ctg	cag	gcc	1653		

55										75565										56										
Trp	Arg	Arg	Asp	Pro	Glu	Glu	Arg	Pro	Thr	Phe	Glu	Tyr	Leu	Gln	Ala															
500						505					510																			
ttc	ctg	gag	gac	tac	ttc	acc	tcg	aca	gag	ccc	cag	tac	cag	cct	gga															1701
Phe	Leu	Glu	Asp	Tyr	Phe	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Gln	Tyr	Gln	Pro	Gly															
515					520				525						530															
gag	aac	cta	taggcctgga	gctcctcctg	gaccagagggc	ctcgctgtgg	ggtagcagg								1759															
Glu	Asn	Leu																												

<210> 3
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Купча

<400> 3
 Met Gly Ser Ser Lys Ser Lys Pro Lys Asp Pro Ser Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Glu Pro Pro Asp Ser Thr His His Gly Gly Phe Pro Ala Ser
 20 25 30

Gln Thr Pro Asn Lys Thr Ala Ala Pro Asp Thr His Arg Thr Pro Ser
 35 40 45

Arg Ser Phe Gly Thr Val Ala Thr Glu Pro Lys Leu Phe Gly Gly Phe
 50 55 60

Asn Thr Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Arg Thr
 85 90 95

Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln Ile Val Asn
 100 105 110

Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Thr Thr Gly Gln
 115 120 125

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp Ser Ile Gln
 130 135 140

Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu Ser Glu Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Leu Asn Pro Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu Val Arg Glu
 165 170 175

Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser Asp Phe Asp
 180 185 190

Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg Lys Leu Asp
 195 200 205

Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Ser Ser Leu Gln
 210 215 220

Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu Cys His Arg
 225 230 235 240

Leu Thr Asn Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Leu Ala
 245 250 255

57	75565	58
Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu Glu Val Lys 260 265 270		
Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr Trp Asn Gly 275 280 285		
Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr Met Ser Pro 290 295 300		
Glu Ala Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu Arg His Glu 305 310 315 320		
Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro Ile Tyr Ile 325 330 335		
Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe Leu Lys Gly 340 345 350		
Glu Met Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp Met Ala Ala 355 360 365		
Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn Tyr Val His 370 375 380		
Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Leu Val Cys 385 390 395 400		
Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp Asn Glu Tyr 405 410 415		
Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu 420 425 430		
Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe 435 440 445		
Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val Pro Tyr Pro 450 455 460		
Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg Gly Tyr Arg 465 470 475 480		
Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp Leu Met Cys 485 490 495		
Gln Cys Trp Arg Arg Asp Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe Glu Tyr Leu 500 505 510		
Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro Gln Tyr Gln 515 520 525		
Pro Gly Glu Asn Leu 530		

<210> 4

<211> 2187

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> рен

<222> (1) ... (2187)

<223> кДНК с-Src людини

<220>

<221> CDS

<222> (134) ... (1483)

<400> 4

```

gcgccgcgtc ccgcaggccg tgatgccgcc cgcgcggagg tggcccgagc cgcagtgtccc 60
caagagagct ctaatggtac caagtgcacg gttggcttta ctgtgactcg gggacgccag 120
agctcctgag aag atg tca gca ata cag gcc gcc tgg cca tcc ggt aca 169
          Met Ser Ala Ile Gln Ala Ala Trp Pro Ser Gly Thr
          1          5          10
gaa tgt att gcc aag tac aac ttc cac ggc act gcc gag cag gac ctg 217
Glu Cys Ile Ala Lys Tyr Asn Phe His Gly Thr Ala Glu Gln Asp Leu
          15          20          25
ccc ttc tgc aaa gga gac gtg ctc acc att gtg gcc gtc acc aag gac 265
Pro Phe Cys Lys Gly Asp Val Leu Thr Ile Val Ala Val Thr Lys Asp
          30          35          40
ccc aac tgg tac aaa gcc aaa aac aag gtg ggc cgt gag ggc atc atc 313
Pro Asn Trp Tyr Lys Ala Lys Asn Lys Val Gly Arg Glu Gly Ile Ile 60
          45          50          55
cca gcc aac tac gtc cag aag cgg gag ggc gtg aag gcg ggt acc aaa 361
Pro Ala Asn Tyr Val Gln Lys Arg Glu Gly Val Lys Ala Gly Thr Lys 75
          65          70
ctc agc ctc atg cct tgg ttc cac ggc aag atc aca cgg gag cag gct 409
Leu Ser Leu Met Pro Trp Phe His Gly Lys Ile Thr Arg Glu Gln Ala 90
          80          85
gag cgg ctt ctg tac ccg ccg gag aca ggc ctg ttc ctg gtg cgg gag 457
Glu Arg Leu Leu Tyr Pro Pro Glu Thr Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu 105
          95          100
agc acc aac tac ccc gga gac tac acg ctg tgc gtg agc tgc gac ggc 505
Ser Thr Asn Tyr Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Cys Val Ser Cys Asp Gly 120
          110          115
aag gtg gag cac tac cgc atc atg tac cat gcc agc aag ctc agc atc 553
Lys Val Glu His Tyr Arg Ile Met Tyr His Ala Ser Lys Leu Ser Ile 140
          125          130          135
gac gag gag gtg tac ttt gag aac ctc atg cag ctg gtg gag cac tac 601
Asp Glu Glu Val Tyr Phe Glu Asn Leu Met Gln Leu Val Glu His Tyr 155
          145          150
acc tca gac gca gat gga ctc tgt acg cgc ctc att aaa cca aag gtc 649
Thr Ser Asp Ala Asp Gly Leu Cys Thr Arg Leu Ile Lys Pro Lys Val 170
          160          165
atg gag ggc aca gtg gcg gcc cag gat gag ttc tac cgc agc ggc tgg 697
Met Glu Gly Thr Val Ala Ala Gln Asp Glu Phe Tyr Arg Ser Gly Trp 185
          175          180
gcc ctg aac atg aag gag ctg aag ctg ctg cag acc atc ggg aag ggg 745
Ala Leu Asn Met Lys Glu Leu Lys Leu Leu Gln Thr Ile Gly Lys Gly 200
          190          195
gag ttc gga gac gtg atg ctg ggc gat tac cga ggg aac aaa gtc gcc 793

```


61										75565										62										
Glu	Phe	Gly	Asp	Val	Met	Leu	Gly	Asp	Tyr	Arg	Gly	Asn	Lys	Val	Ala															
205					210					215					220															
gtc aag tgc att aag aac gac gcc act gcc cag gcc ttc ctg gct gaa	841																													
Val Lys Cys Ile Lys Asn Asp Ala Thr Ala Gln Ala Phe Leu Ala Glu																														
	225				230					235																				
gcc tca gtc atg acg caa ctg cgg cat agc aac ctg gtg cag ctc ctg	889																													
Ala Ser Val Met Thr Gln Leu Arg His Ser Asn Leu Val Gln Leu Leu																														
	240				245					250																				
ggc gtg atc gt gag gag aag ggc ggg ctc tac atc gtc act gag tac	937																													
Gly Val Ile Val Glu Glu Lys Gly Leu Tyr Ile Val Thr Glu Tyr																														
	255				260					265																				
atg gcc aag ggg agc ctt gtg gac tac ctg cgg tct agg ggt cgg tca	985																													
Met Ala Lys Gly Ser Leu Val Asp Tyr Leu Arg Ser Arg Gly Arg Ser																														
	270				275					280																				
gtg ctg ggc gga gac tgt ctc ctc aag ttc tgc cta gat gtc tgc gag	1033																													
Val Leu Gly Gly Asp Cys Leu Leu Lys Phe Ser Leu Asp Val Cys Glu																														
	285				290					295					300															
gcc atg gaa tac ctg gag ggc aac aat ttc gtg cat cga gac ctg gct	1081																													
Ala Met Glu Tyr Leu Glu Gly Asn Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala																														
	305				310					315																				
gcc cgc aat gtg ctg gtg tct gag gac aac gtg gcc aag gtc agc gac	1129																													
Ala Arg Asn Val Leu Val Ser Glu Asp Asn Val Ala Lys Val Ser Asp																														
	320				325					330																				
ttt ggt ctc acc aag gag gcg tcc agc acc cag gac acg ggc aag ctg	1177																													
Phe Gly Leu Thr Lys Glu Ala Ser Ser Thr Gln Asp Thr Gly Lys Leu																														
	335				340					345																				
cca gtc aag tgg aca gcc cct gag gcc ctg aga gag aag aaa ttc tcc	1225																													
Pro Val Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ala Leu Arg Glu Lys Lys Phe Ser																														
	350				355					360																				
act aag tct gac gtg tgg agt ttc gga atc ctt ctc tgg gaa atc tac	1273																													
Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Tyr																														
	365				370					375					380															
tcc ttt ggg cga gtg cct tat cca aga att ccc ctg aag gac gtc gtc	1321																													
Ser Phe Gly Arg Val Pro Tyr Pro Arg Ile Pro Leu Lys Asp Val Val																														
	385				390					395																				
cct cgg gtg gag aag ggc tac aag atg gat gcc ccc gac ggc tgc ccg	1369																													
Pro Arg Val Glu Lys Gly Tyr Lys Met Asp Ala Pro Asp Gly Cys Pro																														
	400				405					410																				
ccc gca gtc tat gaa gtc atg aag aac tgc tgg cac ctg gac gcc gcc	1417																													
Pro Ala Val Tyr Glu Val Met Lys Asn Cys Trp His Leu Asp Ala Ala																														
	415				420					425																				
atg cgg ccc tcc ttc cta cag ctc cga gag cag ctt gag cac atc aaa	1465																													
Met Arg Pro Ser Phe Leu Gln Leu Arg Glu Gln Leu Glu His Ile Lys																														
	430				435					440																				
acc cac gag ctg cac ctg tgacggctgg cctccgcctg ggatcatgggc	1513																													
Thr His Glu Leu His Leu																														
	445				450																									
ctgtgggggac tgaacctgga agatcatgga cctgggtgccc ctgctcactg ggccccgagcc	1573																													

tgaactgagc cccagcgggc tggcgggect ttttctgcg tcccagcctg caccctccg 1633
 gcccgtctc tcttgaccc acctgtggg cctggggagc ccactgaggg gccagggagg 1693
 aaggaggcca cggagcggga ggcagcgccc caccacgtcg ggcttccttg gcctcccgcc 1753
 actcgcttc ttagagtttt attcctttcc ttttttgaga tttttttcc gtgtgtttat 1813
 tttttattat ttttcaagat aaggagaaag aaagtaccca gcaaattgggc attttacaag 1873
 aagtaagaat cttatttttc ctgtcctgcc cgtgaggggtg ggggggaccg ggccctctc 1933
 tagggacccc tcgccccagc ctcattcccc attctgtgtc ccatgtcccg tgtctcctcg 1993
 gtgcgcccggt gtttgcgctt gaccatgttg cactgtttgc atgcgccga ggcagacgtc 2053
 tgtcaggggc ttggatttcg tgtgccgtg ccaccgccc acccgcttg tgagatggaa 2113
 ttgtaataaa ccacgccatg aggacaccgc cgccgcctc ggcgcttct ccaccgaaaa 2173
 aaaaaaaaaa aaaa 2187

<210> 5
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 5
 Met Ser Ala Ile Gln Ala Ala Trp Pro Ser Gly Thr Glu Cys Ile Ala
 1 5 10 15
 Lys Tyr Asn Phe His Gly Thr Ala Glu Gln Asp Leu Pro Phe Cys Lys
 20 25 30
 Gly Asp Val Leu Thr Ile Val Ala Val Thr Lys Asp Pro Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Lys Ala Lys Asn Lys Val Gly Arg Glu Gly Ile Ile Pro Ala Asn Tyr
 50 55 60
 Val Gln Lys Arg Glu Gly Val Lys Ala Gly Thr Lys Leu Ser Leu Met
 65 70 75 80
 Pro Trp Phe His Gly Lys Ile Thr Arg Glu Gln Ala Glu Arg Leu Leu
 85 90 95
 Tyr Pro Pro Glu Thr Gly Leu Phe Leu Val Arg Glu Ser Thr Asn Tyr
 100 105 110
 Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Cys Val Ser Cys Asp Gly Lys Val Glu His
 115 120 125
 Tyr Arg Ile Met Tyr His Ala Ser Lys Leu Ser Ile Asp Glu Glu Val
 130 135 140
 Tyr Phe Glu Asn Leu Met Gln Leu Val Glu His Tyr Thr Ser Asp Ala
 145 150 155 160
 Asp Gly Leu Cys Thr Arg Leu Ile Lys Pro Lys Val Met Glu Gly Thr
 165 170 175
 Val Ala Ala Gln Asp Glu Phe Tyr Arg Ser Gly Trp Ala Leu Asn Met

кДНК с-SRC КУРЧАТИ

ИДЕНТ. № ПОСЛ.: 2

1 tctgacaccc atctgtctgt ctgtctgtgt gctgcaggag ctgagctgac tctgtgtgg
61 cctcggctac cactgtggcc agcggtgtgagg tgggacgtgc agccaccac catggggaggc
121 agcaagagca agcccaaggc cccagccag cggcggtgga gcttggagcc acccgacaga
181 acccaaccag ggggattccc agcctggcag accccacaa agacagcagc ccccgacagc
241 caccgacccc cagccgctc ctttgggacc gtggccacc agcccaagct ctccgggggc
301 ttaacacatt ctgacacgt taccgtggcc cagctgtccc gggcactggc tggcggcgct
361 accactttcg tggctctcta cgaactagag tccggagctg aaacggactt gtccttcaag
421 aaaggaganc gctgcagat tctcaaacac atgggaagggt actgtggctt ggtctatcc
481 ctactacag gacagagggg ctacatccc agtaactatg tggcgccctc agactccatc
541 caggctgaag agtggtaatt tgggaagatc atctgtcggg agtccgagcg gctgtgtctc
601 aaccccgaaa acccccgggg aaccttttgg gtccgggaga gctgagcagc aaagggtggc
661 tattgctct cgttttga cttgacac gcccaggggc tcaatgtgaa gcaactaag
721 atccgaagc tggacagggc cggctctac ataccctac gcaacagtt cagcagcctg
781 cagcagctgg tggcctacta ctccnaacat gctgtgtggt tgtgccaccg cctgacacac
841 gtctgcccac cgtccagcc cagacccag ggaactgcca agnacgggtg ggaactcccc
901 cgggagctgc tggcggtgga ggtgaagctg gggcagggtt gcttgggaga ggtctgtgatg
961 gggacattgga acggcaccac cagagtggtg atnaagactc tgaagccggg caccatgtcc
1021 cgggagggct tctgtcagga agcccaagtg atgaagaagc tccggcatga gaagctgtgt
1081 cagctgtacg cagtgtgtgt ggaagagccc atctacatcg tcaatgtgta catgagcag
1141 gggagcctcc tggatttctt gaaggagag atggcgaagt acctggcggt gccacagctc
1201 gtcgatatgt ctgtcagat tgcacccggc atggcctatg tggagaggtt gnaactagct
1261 caccgagcag tggcggtggc caactcctg tggggggaga acctgtgtgt caaggtgtgt
1321 gactttgggc tggcagcctt catcgaggac aacgagtaac cagcagggca aggtgccaa
1381 tccccatca agtggacag ccccgaggca gccctatg gcccgttacc catcaatgct
1441 gatgtgtgt ccttggcct cctgtgtact gaggcagca ccaagggtcg ggtgccatc
1501 ccaggagatg tcaacaggga ggtgtctgac caggttgaga ggggtacccg catgcccctg
1561 cggcccgagt gcccagagc gctgctgac ctactgtcc agtctgtggc gagggaacct
1621 gaggagcggc ccaatttga gtactcag cctctctg aggaactt cactctgaca
1681 gaggccagc accagcctg agagaacct taggcctgga gctctctg gaccagaggg
1741 ctgctgtgt ggtacagg

КОДОВАНИЙ БЛОК с-SRC КУРЧАТИ

ИДЕНТ. № ПОСЛ.: 3

MGSSKSKPKDPSQRRRLSEPPDSTHHGGFASQTPNKTA
PDTHRTPSRSFGTVATEPKLFGGFNTSDTVTSQPRAGALA
GGVTTTFVALDYESRTETDLSEFKGERLQVNNTEGDWWL
AHSLLTGTGTGYPNSYVAPSDSIQAEWYFGKITRRESER
LLNPNENPRGTFLVRESEITTKGAYCLSVSDFDNAGLNVK
HYKIRKLDGSGFYTSRTQFSSLLQLVAYSKHADGLCHR
LTNVCPTSKPQTQGLAKDAWEIPRESRLLEVLKGGCGFGE
VWMGTWNGTTRVAIKTLKPGTMSPEALFQEAQVMKKLRHE
KLVLQLYAVVSEPIYIVTEYMSKGLDLKMGEMGYLRL
PQLVDMAAQIASGMAVYERMNVYHRDLRAANILVGENL
VCKVADFLARLIEDNEYTARQAGKFKWTAPEAALYGR
FTKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPMVNRVLDQVERG
YRMPCEPESLHDLMCQWRDPEERPTFEYLQAFLE
DYFTSTEPQYQGENL

Фиг. 1

Фиг. 2

кДНК с-SRC ЛЮДИНИ

ИДЕНТ. № ПОСЛ.: 4

1 ggcgcgcgc cgcagggcgt tgaatggcc cgcgcggagg tggcccgac cgcagtgccc
61 caagagagct ctaatgttac caagtacag gttggctta ctgtgactgc gggacgccag
121 agctcctgag aagatgtcag caatacagc cgcctggcca tccggtacag aatgtattgc
181 caagtacaac ttccacggca ctgccagca ggcctggccc ttctgcaag gagacgtgct
241 caacattgtg ggcgtacca aggaacccaa ctgtacaaa gcaaaaaca aggtggggcg
301 tgggggcatc atcccagcca actacgtcca gaagcggggg ggcgtgaagg cgggtacca
361 actcagcctc atgcttgggt tccacggcaa gatcacagg gacagggctg agcggctct
421 gtacccgccc gagacaggcc ttttctgtgt gggggagagc accaactacc cgggagacta
481 cagcgtgtgc gtgagctgc agggcaaggt ggaagcactc cgcactatgt accatgccag
541 caagctcagc atcgacgagg aggtgtactt tgagaacctc atgcagctgg tggagacta
601 cactcagac gcagatggac tctgtacgc cctcattaaa ccaagggtca tggagggcac
661 agtggcgccc caggatgagt tctaccgag cggctggccc ctgaactga aggagctgaa
721 gctgtgtcag accatcgga agggggaggt cggagacgtg atgtggggc attaccgagg
781 gaacaaagtc ggcgtcaagt gattaaaga cagcgcact cccagggcct tctgtgctga
841 agcctcagtc atgacgcaac tggcgcatag caactgggtg cagctcctg cgtgtatgt
901 gggggagag ggcgggctct acatgtctac tgaatcatg gcaaggggga gcttgtgga
961 ctacctcgc tctagggtc ggtcagtgct gggcgagagc tctctctca agttctgct
1021 agatgtgtgc gaggccatgg aatacctgga gggcaacaat tctgtcatc gagacctggc
1081 tggccgcaat gtgtgtgtgt ctgaggaca cgtggccaag gtcagcagct ttgtctcac
1141 caaggaggcg tccagcacc aggcacggg caagctgcca gtaagtga cagccctga
1201 gggcctgaga gagaagaaat tctcactaa gtcgtacgtg tggagtttg gaatctctt
1261 ctgggaatc tactccttg ggcgagtgcc ttatcaaga attccccga aggagctgt
1321 cctcgggtg gagaagggtt acaagatgga tggcccgac ggtgtcccgc cgcagctta
1381 tgaagtcatg aagaactgt ggcactgga cggcgcatg cggccctct tctacagct
1441 ccgagagcag ctgagcaca tcaaaacca cagctgcac ctgtgacggc tggcctccgc
1501 ctgggtcatg ggcctgtggg gactgaacct ggaagatcat ggaactgtgt cccctgtca
1561 ctggggcccga gctgaactg agcccagcg ggcgtggggc ctttttctt gctgccagc
1621 ctgcacctc cggcccccgt ctctcttga cccacctgt gggcctgggg agccactga
1681 gggggcagg aggaaggagg ccacggagc ggaaggcagc cccaccagc tgggcttcc
1741 ctggcctccc gccactgcc ttctagagt ttattctt tctttttt agatttttt
1801 tccgtgtgt tatttttat tattttcaa gataaggaga aagaagtac ccagcaaatg
1861 ggcatttac aagaagtac aattattt ttctgtct gccgtgagg gtggggggga
1921 cggggccct ctctaggag cctcgcgcc agcctcatt cccattctt gtcctatgt
1981 cgtgtgtcc tgggtgcc cgtgtttgc ctgacatg ttgactgt tgcagtcgc
2041 cgaggcagc gctgtgagg gcttggatt tctgtgccc ctgccaccg cccaccgcc
2101 ttgtgatag gaattgaaat aaaccagcc atgaggacac cggcccccgc ctggcgctt
2161 cctccaccga aaaaaaaaa aaaaaaa

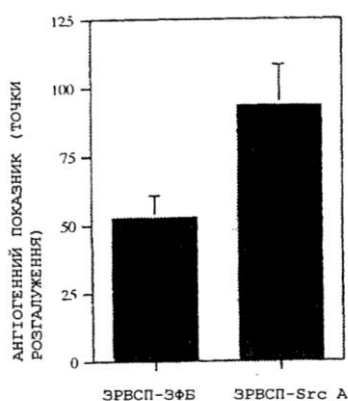
Фиг. 3

ІДЕНТ. № ПОСЛ.: 5

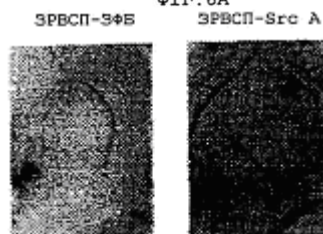
MSAIQAAWPSGTECIAKYNFHGTAEQDLFPCKGDVLTIVAVTKD
 FNWYKAKNKVGREGIPANYVQKREGVKAGTKLSLMPWFHGKIT
 REQAERLLYPETGLFLVRESTNYPGDYTLVSCDGKVEHYRIMY
 HASKLSIDEEVYFENLMQLVEHYTSDADGLCTRILKPKVMEGTVA
 AQDEFYRSGWALNMKELKLLQTGKGEGFDVMLGDYRGNKVAV
 KCIKNDATAQAFLAEASVMTQLRHSNLVQLLGIVVEEKGGLYVTE
 YMAKGS�VDYLSRGRSVLGGDCLLKFSLDVCEAMEYLEGNFVH
 RDLAARNVLVSEDNVAKVSDFLTKASSTQDTGKLPVKWTAPAL
 REKKFSTKSDVWSFGILLWEIYSFGRVYPRIPLKDVVPRVEKGYKM
 DAPDGCFFAVYEVVMKNCWHLDAAMRPSFLQLREQLNIKHTELHL

Фіг. 4

Вплив ретровірусної ЗРВСП експресії
 Src A на ангиогенез у ХАМ курчати

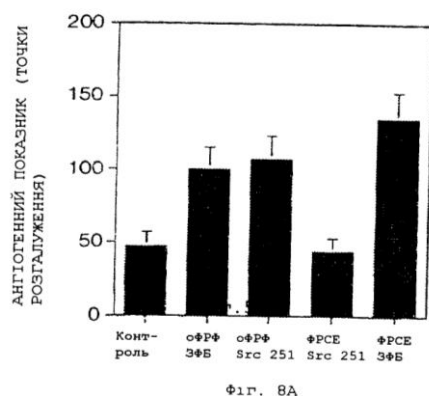


Фіг. 6A



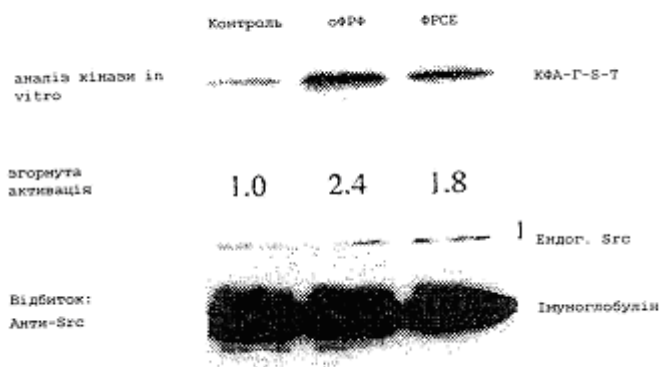
Фіг. 6B

Вибіркові вимоги до активності Src під час
 ангиогенезу, викликаного ФРСЕ, але не оФРФ



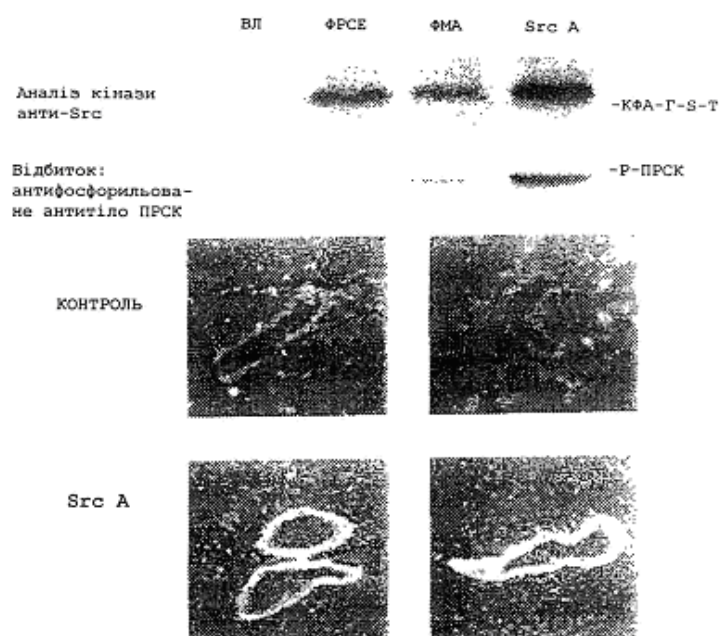
Фіг. 8A

Активация эндогенного Src за допомогою
 оФРФ та ФРСЕ

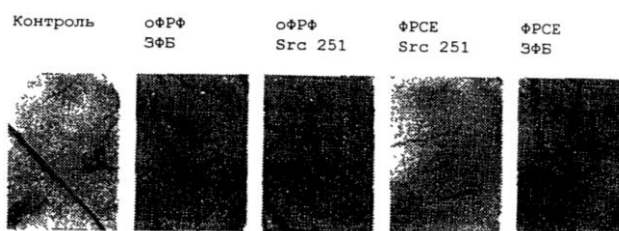


Фіг. 5

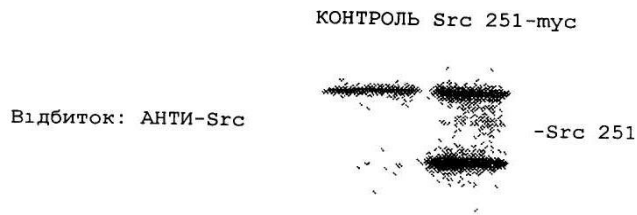
Ретровірусна експресія Src A активує
 фосфорилювання васкулярної АМР кинази



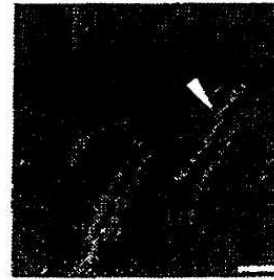
Фіг. 7



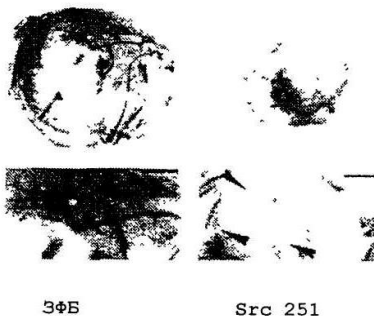
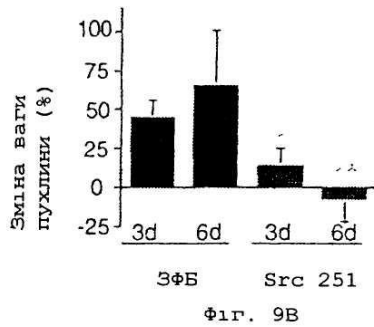
Фіг. 8B



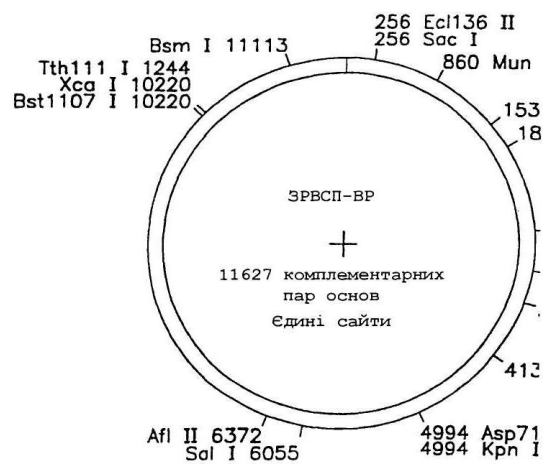
Фіг. 8С



Фіг. 9А



Фіг. 9С



Фіг. 10

<222> (7166)

<223> нижче

<220>

<221> зміш_F

<222> (7166)

<223> U3

<220>

<221> зміш_F

<222> (7394)

<223> R

<220>

<221> зміш_F

<222> (7415)

<223> U5

<220>

<221> зміш_F

<222> (7154)

<223> PPT

<220>

<221> зміш_F

<222> (388)

<223> донор

<220>

<221> зміш_F

<222> (5074)

<223> акцепт

<220>

<221> зміш_F

<222> (6982)

<223> акцепт

<220>

<221> ген

<222> (372)

<223> gag p1

<220>

<221> ген

<222> (909)

<223> gag p1

<220>

<221> ген

<222> (1095)

<223> gag p2

<220>

<221> ген

<222> (1843)

<223> gag p1

<220>

<221> ген

<222> (2109)

<223> gag p1

<220>