



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1779263 A3

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР
(ГОСПАТЕНТ СССР)

(51)5 C 12 N 15/53

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

1

(21) 4202612/13
(86) PCT/DK 86/00098 (02.09.86)
(22) 30.04.87
(31) 4027/85
(32) 03.09.85
(33) DK
(46) 30.11.92. Бюл. № 44
(71) Симбиком Актиеболаг (CH)
(72) Стефан Марклунд и Томас Эдлунд (SE)
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ
ПЕРЕКИСНОЙ ДИСМУТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

2

(57) Использование: генетическая инженерия, биохимия и способы получения перекисной дисмутазы. Сущность изобретения: способ заключается в том, что конструируют рекомбинантную плазмидную ДНК рPS3-нео-18, содержащую фрагмент ДНК, кодирующий внеклеточную дисмутазу, трансформируют полученной ДНК линии клеток CHO, культивируют трансформированные клетки с последующим выделением и очисткой целевого продукта. 1 табл.

Изобретение относится к способам получения перекисной дисмутазы и ее использованию для терапевтического лечения.

Некоторые соединения имеют тенденцию к самоокислению. Все процессы самоокисления приводят к образованию токсичных промежуточных соединений восстановления кислорода. Самоокисление адреналина, пирогаллола и других соединений приводит к образованию перекисного радикала. Небольшая часть восстановления кислорода в митохондриях приводит к образованию перекиси, а в дальнейшем — перекиси водорода. Микросомная цитохромная P₄₅₀ — система также высвобождает высший окисел.

Перекись водорода образуется всегда, когда образуется высший окисел в результате реакции дисмутации. Большинство оксидаз в организме непосредственно восстанавливает кислород в перекись водорода.

Ионизирующее излучение расщепляет воду с образованием атомов водорода и гидроксильных радикалов. Образующиеся та-

ким образом гидроксильные радикалы характерны для большей части биологических опасностей, к которым приводит ионизирующее излучение.

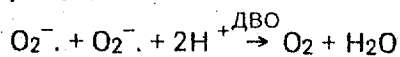
В системе оксидазы ксантина, например, образуется не только высший окисел, но также перекись водорода, как непосредственно, так и в результате дисмутации высшего оксида. Эти соединения могут затем взаимодействовать с образованием гидроксильного радикала. Система оксидазы ксантина повреждает протеины, углеводы и нуклеиновые кислоты, а также убивает клетки. Из биохимических соединений полиненасыщенные липиды оказываются наиболее чувствительными к токсичному воздействию кислорода. Промежуточные соединения кислорода могут инициировать цепные реакции, включающие молекулярный кислород, так называемое окисление липида в перекисное соединение. Гидроперекиси липидов, образующиеся таким образом, и продукты их разложения не только наносят ущерб функциям клеточных мемб-

(19) SU (11) 1779263 A3

ран, но могут также повреждать другие компоненты клеток.

Организмы, живущие в присутствии кислорода, были вынуждены в процессе эволюции создать несколько защитных механизмов против токсичных метаболитов восстановления кислорода. К защитным факторам относятся дисмутазы высших окислов (ДВО), которые подвергают дисмутации радикал высшего окисла, и содержатся в относительно постоянных количествах в клетках ткани млекопитающих. Самым известным из этих ферментов является ДВО-CuZn, который является димером с молекулярным весом 33000, содержащим два атома меди и два атома цинка. ДВО-CuZn обнаружен в цитозоле и в межмембранном промежутке митохондрий. ДВО-Mn является тетрамером с молекулярным весом 85000, содержащим 4 атома Mn, и он сосредоточен главным образом в митохондриальной матрице. До последнего времени предполагали, что внеклеточные жидкости не обладают ДВО-активностью.

Недавно установлено присутствие дисмутазы высшего окисла во внеклеточной жидкости (например, плазме крови, лимфе, синовиальной жидкости и цереброспинальной жидкости), которая была названа EC-SOD (ВК-ДВО), внеклеточная дисмутаза высшего окисла). У человека активность на мл плазмы составляет менее 1% от общей ДВО-активности на г ткани, но она видимо активно регулируется организмом. Сходство с лектинами указывает на то, что в отличие от ДВО CuZn этот фермент является гликопротеином. Он видимо состоит из четырех равных нековалентно связанных субъединиц с общим (тетрамерным) молекулярным весом 135000 с содержанием металлов: один атом Cu и один атом Zn на одну субъединицу. Фермент катализирует дисмутацию первого порядка радикала высшего окисла, как это делают другие ДВО, содержащие Cu.



Удельная активность является очень высокой и, видимо, объясняется наличием четырех атомов Cu в молекуле. При хроматографии на гепарин-Сефарозе этот фермент разделяется на три фракции, А – без какого-либо средства, В – со слабым средством и С – с сильным средством относительно гепарина. В отличие от поведения ВК-ДВО, ДВО-CuZn и ДВО-Mn не связываются с гепарин-Сефарозой. Этот фермент обладает определенным гидрофобным характером, который может указывать на сродство с клеточными мембранами. Срод-

ство с гепарином часто указывает на сродство с сульфатом гепарина, который содержится на поверхности клетки, в частности, на эндотелии кровеносных сосудов. Следовательно, можно предположить, что ВК-ДВО частично локализована на поверхности клеток, а частично во внеклеточных жидкостях. Аминокислотный состав и антигенная активность совершенно не похожи на те же показатели исследованных ранее ДВО-изоферментов. Информационная РНК, кодирующая ВК-ДВО, содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид, что указывает на то, что ВК-ДВО является секретлируемым протеином, и РНК, кодирующая ДВО-CuZn, с другой стороны, не содержит такую последовательность, кодирующую сигнальный пептид. Кроме того, аминокислотная последовательность ВК-ДВО отличается от аминокислотной последовательности других ДВО-изоферментов; как было установлено, ВК-ДВО содержится в плазме всех исследованных видов млекопитающих, а также у птиц и рыб. Содержание варьирует в широких пределах от вида к виду, но внутривидовые вариации очень незначительны. В плазме грызуна содержится в 10–20 раз больше ВК-ДВО, чем в плазме человека, в которой содержится сравнительно мало ВК-ДВО. ВК-ДВО был также обнаружен во всех типах исследованной ткани животного. В тканях внутривидовые различия значительно слабее. Концентрация ВК-ДВО в тканях (единиц на грамм влажного веса) выше, чем концентрация ВК-ДВО в плазме (единиц/мл) у человека. У грызунов ткань и плазма содержат приблизительно равные количества ВК-ДВО.

Активность ДВО делает их интересными кандидатами на использование в качестве терапевтических агентов с целью подавления токсичных эффектов высших окислов и других кислородных радикалов.

Ввиду вышеупомянутой низкой концентрации ДВО-активности во внеклеточных жидкостях, компоненты во внеклеточной жидкости и поверхности клеток являются наименее защищенными против радикалов высших окислов и других токсичных продуктов восстановления кислорода по сравнению с внутренностью клетки. Таким образом, ВК-ДВО образует особенно интересный продукт для терапевтических применений в связи с внеклеточным образованием радикалов высших окислов.

Важным аспектом изобретения является то, что оно относится к ВК-ДВО рекомбинантного происхождения.

ДНК-последовательность, кодирующая ВК-ДВО, или ее модификации или производные, как они были определены выше, может иметь природу комплементарной ДНК (кДНК), т. е. она может быть "сконструирована" при помощи образования кДНК-библиотеки на основе иРНК из клеток, продуцирующих ВК-ДВО, посредством известных стандартных приемов и векторов. Эксперименты с гибридизацией могут быть затем осуществлены с использованием синтетических олигонуклеотидов в качестве зондов с тем, чтобы идентифицировать кДНК-последовательность, кодирующую ВК-ДВО. В качестве альтернативы ДНК-последовательность может носить геномную природу, то есть, она может быть получена непосредственно из клеточного генома, например, при помощи отбора геномных последовательностей, гибридизирующихся с ДНК-зондом, полученным на основе полной или частичной аминокислотной последовательности ВК-ДВО. Для терапевтических целей предпочтительным вариантом является ДНК-последовательность ВК-ДВО человеческого происхождения с тем, чтобы избежать неблагоприятных иммунных реакций.

ДНК-последовательность может также иметь синтетическую природу. ДНК-последовательность может быть смешанной, синтетической и геномной природы, смешанной геномной и кДНК природы, или смешанной кДНК и синтетической природы, полученной лигированием ДНК-фрагментов кДНК, геномной или синтетической природы (в зависимости от необходимости), причем ДНК-фрагменты содержат часть гена, кодирующего ВК-ДВО, эти процедуры выполняются при помощи стандартных приемов.

Изобретение относится к способному к репликации вектору экспрессии, который содержит ДНК-последовательность, кодирующую ВК-ДВО. Непосредственно вниз от этой последовательности (последовательности, кодирующей ВК-ДВО) может содержаться последовательность кодирующая сигнальный пептид, присутствие которого гарантирует секретирование ВК-ДВО, экспрессированной клеткой-хозяина, в которую был введен вектор. Сигнальной последовательностью может быть, например, следующая последовательность:

```

15      -18      -10      -1
      MetLeuAlaLeuCyserCysLeuLeuLeuAlaAl
aGlyAlaSerAspAla
      ATGCTGGCGCTACTGTGTTCCCTGCCTG
20      CTCCTGTGCAGCCGGTGCCTCSGACGCC
      TAGGACCGCGATGACACAAGGACGGA
      CTGACCACCGTCCGCCACGAAGCCYTGGG
                                           120

```

Эта сигнальная последовательность составляет предмет настоящего изобретения и предполагается, что она может быть вставлена в направлении вниз от ДНК-последовательностей, кодирующих другие протеины или пептиды с тем, чтобы обеспечить секретирование полученных в результате продуктов из клеток.

Такой линией клеток является СНО-K1/pPS Знео-18, которая сдана 27 августа 1986 г. в Европейское Собрание Культур Клеток Животных под шифром хранения ECACC 86082701.

Изобретение относится также к ДНК-фрагменту, который кодирует ВК-ДВО и который содержит следующую ДНК-последовательность:

```

      -18      -10
      MetLeuAlaLeuLeuCysSerCysLeuLeuLeuAlaAlaGlyAlaSerAsp
      ATGCTGGCGCTACTGTGTTCCCTGCCTGCTGGCAGCCGGTGCCTCGGAC
      TACGACCGCGATGACACAAGGACGGACGACCGCTCGGCCACGGAGCCTG
      -1 +1      10      120
      AlaTrpThrGlyGluAspSerAlaGluProAsnSerAspSerAlaGluTrpIleArgAsp
      GCCTGGACGGGCGAGCACTCGGCCGAGCCCAACTCTGACTCGGCCGAGTGGATCCGAGAC
      CGGACCTGCCCGCTCCTGAGCCGCTCGGGTTGAGACTGAGCCGCTCACCTAGGCTCTG
      20      30      180
      MetTyrAlaLysValThrGluIleTrpGlnGluValMetGlnArgArgAspAspAspGly
      ATGTACGCCAAGGTCACGGAGATCTGGCAGGAGGTCATGCAGCGGGGGACGACGCGG
      TACATGCCGGTTCAGTGCCTCTAGACCGTCCCTCCAGTACGTGCGCCGCCCTGCTGTCGG
      40      50      240
      ThrLeuHisAlaAlaCysGlnValGlnProSerAlaThrLeuAspAlaAlaGlnProArg
      ACGCTCCACGGCCGCTGCCAGGTGCAGCCGTCGGCCACGCTGGACGCGCGGCGAGCCCGG
      TGCGAGGTGCGGGCGGACGCTCCACGTCGGCAGCCGGTTCGACCTGCGGGCGGTCGGGGCC
      60      70      300
      ValThrGlyValValLeuPheArgGlnLeuAlaProArgAlaLysLeuAspAlaPhePhe
      GTGACCGGCTGCTCCTCTTCCGGCAGCTTGGCCGCCCGCCAGCTCGACGCTCTCTTC
      CACTGGCCGACGAGGAGAAGGCCGTCGAACGCGGGGCGCGCTTCGAGCTGCGGAAGAAG
      360

```

80 90
AlaLeuGluGlyPheProThrGluProAnSerSerArgAlaIleHisValHisGln
 GCCCTGGAGGCTTCCCGACCGAGCCGAACAGCTCCAGCCGCGCCATCCACGTGCACCA
 CCGGACCTCCCGAAGGGCTGGCTCGGCTTGTTCGAGGTCGGCGCGGTAGGTGCACGTGGTC 420

100 110
PheGlyAspLeuSerGlnGlyCysGluSerThrGlyProHisTyrAsnProLeuAlaVal
 TTCGGGGACCTCAGCCAGGGCTGGAGTCCACCGGGCCCCACTACAACCCGCTGGCCGTG
 AAGCCCTGGACTCGGTCCCGACGCTCAGGTGGCCCCGGGGTGTGTGGGGCGACCGGCAC 480

120 130
ProHisProGlnHisProGlyAspPheGlyAsnPheAlaValArgAspGlySerLeuTrp
 CCGCACCCGACGACCCCGGGCACTTCGGCAACTTCGCGGTCCGCGACGGCAGCCTCTGG
 GCGTGGGCTCGTGGGCCCGCTGAAGCGTTGAAGCGCCAGGCGCTGCCGTCCGGAGACC 540

140 150
ArgTyrArgAlaGlyLeuAlaAlaSerLeuAlaGlyProHisSerIleValGlyArgAla
 AGGTACCGCGCCGGCTGGCCGCTCGCTCGCGGGCCCGCACTCCATCGTGGGCCGGGCC
 TCCATGGCGCGGCCGGACCGGGAGCGAGCGCCCGGGCGTGAGGTAGCACCCGGCCCGG 600

160 170
ValValValHisAlaGlyGluAspAspLeuGlyArgGlyGlyAsnGlnAlaSerValGlu
 GTGGTTCGTCCACGCTGGCGAGGACGACTGGGCCCGCGGCAACCAGGCCAGCCTGGAG
 CACCAGCAGGTGGCACCGCTCCTGCTGGACCCCGGCGCCGCGTGGTCCGCTCCGACCTC 660

180 190
AsnGlyAsnAlaGlyArgArgLeuAlaCysCysValValGlyValCysGlyProGlyLeu
 AACGGAAACCGGGCCCGCGCTGGCTGCTGCTGGTGGGGCTGTGGGGCCCCGGGCTC
 TTGCCCTTGGCCCCGGCCCGGACCGGACGACGCCACCACCCGCACACGCCCGGGCCCGAG 720

200 210
TrpGluArgGlnAlaArgGluHisSerGluArgLysLysArgArgArgGluSerGluCys
 TGGGAGCCGACGGCGCGGCGAGCACTCAGAGCGCAAGAAGCGGGGGCGGAGAGCGAGTGC
 ACCCTCGCGCTCCGCGCCCTCGTGAGTCTCGCGTTCTTCGCGCCCGCGCTCTCGCTCACG 780

220
LysAlaAla***
 AAGGCCGCTGA
 TTCGGCGGACT

Необходимо отметить, что эта последовательность включает кодирующую последовательность сигнального пептида; приведенную выше. Сигнальная последовательность простирается от акинокислоты -18 до -1. Последовательность, кодирующая зрелый ВК-ДВО, начинается в аминокислоте +1.

Клетки, продуцирующие ВК-ДВО, могут быть идентифицированы иммуногистохимическим способом с использованием антител, направленных против ВК-ДВО или при помощи анализа на секретирование ВК-ДВО в среду, в которой культивируют специфичные клетки.

Как уже было упомянуто выше, ВК-ДВО проявляет сродство с гепарином, что указывает на сродство с сульфатом гепарина или другими гепариноподобными глюкозаминогликанами, содержащимися на поверхности клетки, в частности, на поверхности клеток эндотелия. Таким образом, имеет смысл индуцировать высвобождение ВК-ДВО с поверхностей клеток и тем самым обеспечить улучшенный выход ВК-ДВО вы-

ращиванием клеток в среде, содержащей гепарин или гепариновый аналог.

ДНК-фрагмент, содержащий ДНК-последовательность, кодирующую ВК-ДВО, вставляют в вектор, который вводят в клетку-хозяина, которую затем выращивают на соответствующей среде при подходящих условиях с целью осуществления экспрессии ВК-ДВО, далее ВК-ДВО изолируют. Средой, которую используют для выращивания клеток, может быть любая известная среда, пригодная для этой цели, но в нее необходимо добавить Cu и/или Zn, ВК-ДВО, экспрессированная клетками, может секретироваться, то есть проходить через клеточные мембраны, в зависимости от типа клетки и состава вектора. Если ВК-ДВО продуцируется внутри клетки, то есть не секретирована клеткой, то она может быть выделена с использованием стандартных приемов, включающих разрушение клеток механическими средствами, например, с использованием ультразвука или гомогенизации, или при помощи ферментных или химических средств с последующей очисткой.

Для того, чтобы обеспечить секретирование, ДНК-последовательность, кодирующая ВК-ДВО, должна предваряться последовательностью, кодирующей сигнальный пептид, присутствие которого обеспечивает секретирование ВК-ДВО из клеток так, что по крайней мере значительная часть ВК-ДВО, экспрессированной в клетке, секретирована в культуральную среду и в дальнейшем может быть извлечена оттуда. Экспериментально было установлено, что часть секретированной ВК-ДВО содержится в среде, а часть ВК-ДВО присутствует на поверхности клеток. Таким образом, выражение "секретированный в культуральную среду" включает любой перенос ВК-ДВО через клеточную мембрану, заканчивается ли он в культуральной среде или на поверхности клетки. ВК-ДВО может быть извлечен из среды при помощи стандартных приемов, содержащих фильтрацию клеток и изоляцию секретированного протеина.

Очистка ВК-ДВО возможна с помощью антител, которые используют для хроматографии по принципу сродства. Антитела могут быть либо поликлональными, либо моноклональными антителами. Предпочтительными в настоящее время являются моноклональные антитела, так как большая часть моноклональных антител, как было установлено, связывается с антигеном более слабо, чем смесь поликлональных тел, из чего следует, что десорбция может быть осуществлена при умеренных условиях с использованием слабых элементов.

Кроме того, так как все IgG должны быть направлены против ВК-ДВО, гораздо меньшие количества матрицы антител надо будет использовать для адсорбции ВК-ДВО из биологического материала. Десорбция ВК-ДВО потребует меньшие объемы элюента, что упрощает процедуры элюирования, которые в настоящее время весьма трудоемки из-за больших объемов элюента, необходимых для проведения десорбции.

Специфичность моноклональных антител относительно ВК-ДВО видимо выше, чем специфичность поликлональных антител. Элюат, таким образом, будет более чистым, что означает исключение одной или нескольких последующих стадий очистки. Это означает, что процедура получения будет упрощена, а выход будет выше для ВК-ДВО, что представляет собой важное экономическое преимущество.

В большинстве случаев, особенно, когда используют поликлональные антитела для очистки ВК-ДВО, собранный элюат может быть абсорбирован на ионообменной

матрице с последующим элюированием ВК-ДВО-активности и сбором фракций, содержащих ВК-ДВО-активность. Последующая очистка собранного элюата может быть осуществлена при помощи нанесения его на хроматографическую колонку с матрицей, содержащей гепарин или гепариновый аналог, например, сульфат гепарина или любой другой сульфатированный глюкозаминогликан, сульфат декстрана или другое, сильно отрицательно заряженное соединение, и последующего элюирования; далее собирают фракции, обладающие сродством с анализируемым материалом.

Изобретение относится к использованию ВК-ДВО с целью диагностики, профилактики или лечения заболеваний или нарушений, связанных с присутствием или образованием радикалов высших окислов, или других токсичных промежуточных соединений кислорода, образующихся из радикалов высших окислов.

Примерами таких заболеваний или нарушений могут служить ишемия, инфаркт миокарда, почки, мозга или инфаркт кишечника, воспалительные заболевания, такие как ревматический артрит, панкреатит, в частности, острый панкреатит, пиелонефриты и другие типы нефритов, и гепатиты, аутоиммунные заболевания, сахарный диабет (инсулиновой природы), рассеянный склероз, жировая эмболия, расстройство дыхательной системы у взрослых, нарушение дыхательной системы у детей, кровоизлияния в мозг у новорожденных, ожоги, разрушающее воздействие ионизирующего излучения и канцерогенез.

Таким образом, ВК-ДВО может найти по существу такое же применение, что и CuZn-ДВО, терапевтическая активность которой изучена более подробно и обсуждается ниже.

Однако, было установлено, что ВК-ДВО обладает несколькими свойствами, которые, как предполагается, делают ее особенно эффективной в терапевтических приложениях. CuZn-ДВО имеет низкий молекулярный вес (33000), что приводит к тому, что она быстро выводится из организма в результате фильтрации в клубочке в почках так, что в человеческом организме этот фермент имеет период полураспада примерно 20-30 минут. Предварительные эксперименты с ВК-ДВО неожиданным образом показали значительно более продолжительное время полураспада для ВК-ДВО. В настоящее время этот факт частично объясняется высоким молекулярным весом ВК-ДВО, равным 135000, который препятствует ее

выделению из организма в результате фильтрации в клубочке, а частично, тем, что ВК-ДВО, видимо, связывается с поверхностями эндотелия клеток, о чем речь пойдет ниже. При терапевтическом применении ВК-ДВО этот фермент имеет время полураспада в человеческом организме не менее 4 часов, а возможно и больше.

ВК-ДВО является в случае своего нативного окружения секретированным протеином и, таким образом, весьма правдоподобно, что он синтезируется для выполнения функций во внеклеточном пространстве (во внеклеточной жидкости или на поверхностях клеток), которые и позволяют ему проявлять свойства, которые особенно хорошо приспособлены для защиты компонента плазмы или внешней поверхности клеток от токсичных воздействий радикалов высших окислов или других радикалов кислорода. Эта точка зрения подтверждается, например, тем, что ВК-ДВО имеет слабо гидрофобный характер, который способствует ее связыванию с внешней поверхностью клеток, а тот факт, что этот фермент проявляет сродство с гепарином, указывает на сродство с сульфатом гепарина, который обнаружен на внешней поверхности клеток. Таким образом, оба эти свойства указывают на способность защищать ткань, см. примеры, в которых результаты подтверждают связывание ВК-ДВО с эндотелием кровеносных сосудов.

ДВО-активность в терапевтических приложениях была подтверждена для следующих заболеваний или нарушений.

При парентеральном применении CuZn -ДВО проявлял активность в качестве противовоспалительного агента в ряде животных моделей воспалительных процессов, а также при воспалительных заболеваниях животных. У человека положительные эффекты ДВО были отмечены при ревматическом артрите и артрозах, при воспалении мочевого пузыря и других урологических заболеваниях, а также при осложнениях, вызванных в результате лечения ионизирующим излучением. В некоторых странах бычья CuZn -ДВО зарегистрирована в качестве лекарственного препарата (Орготеин, Пероксинорм), который используют главным образом для лечения артритов и артрозов, при этом композицию применяют внутрь суставов.

При парентеральном применении CuZn -ДВО не воспринимается клеткой. CuZn -ДВО, заключенная в липосомы, воспринимается клетками. Была подтверждена ее эффективность против заболевания Крона, заболевания Бечета, язвенных колитов,

заболевания Ковальского и нежелательных эффектов радиационной терапии. Механизм противовоспалительной активности CuZn -ДВО не совсем ясен. Прямая защита от кислородных радикалов, продуцируемых активированными лейкоцитами, была выдвинута в качестве гипотезы. Другая возможность заключается в предотвращении образования сильно хемотактических материалов, вызванного перекисями.

Другой областью применения ДВО является его использование в качестве защитного фактора против разрушения ткани, вызванного ишемией с последующим восстановлением кровотока. Если прерывается подача крови к ткани, то ткань медленно будет превращаться в некротическую. Макро- и микроскопический процесс разрушения в общем случае будет развиваться медленно, в течение нескольких часов. Если кровоток восстанавливается в ткани, например, через 1 ч, то вместо улучшения будет наблюдаться очень сильное ускорение разрушения ткани. Наиболее вероятно, имеется несколько причин для называемого парадокса восстановления кровотока, но кислородные радикалы, которые образуются в результате повторного появления кислорода в ранее ишемической ткани, вносят свой вклад в это разрушение. Так как такие радикалы являются в высшей степени короткоживущими и, следовательно, их трудно изучать непосредственно, их образование и воздействие могут быть проанализированы на основании защитного воздействия различных "пожирателей". Защита тканей была подтверждена в моделях восстановления кровотока при ишемии или аноксии в почке.

Результаты относительно ишемии и последующего восстановления кровотока имеют потенциально важные клинические приложения. Может быть получен исключительно хороший эффект восстановления кровотока в ткани в связи с инфарктами сердца в результате сопутствующего применения ДВО и/или других защитных факторов против кислородных радикалов и тромболитических факторов, например, плазминогенного активатора ткани. Результаты экспериментов с ДВО указывают на то, что ее можно использовать в связи с хирургией сердца и трансплантацией сердца. Аналогичным образом результаты применения ДВО в связи с ишемией почек с последующим восстановлением кровотока могут быть использованы в связи с трансплантацией почек и трансплантацией других органов таких, как кожа, легкие, печень или поджелудочная железа. Заболевание ише-

мия головного мозга является еще одним возможным применением.

ДВО обладают также другими интересными защитными эффектами в связи с другими патологическими заболеваниями.

Например, панкреатит был вызван в поджелудочной железе собаки тремя различными путями: вливание олеиновой кислоты, частичная закупорка выводного протока и ишемия с последующим восстановлением кровотока. Было установлено, что ДВО, каталаза и ДВО + каталаза оказывают защитное воздействие, но в общем случае наиболее эффективным оказывается комбинированное лечение. Эти результаты указывают на возможность активной терапии против этого заболевания, для которого в настоящее время не существует специальной терапии.

Было установлено, что лечение с использованием ДВО является эффективным также при ожогах.

Парентеральное применение CuZn-ДВО предотвращает бронхолегочную дисплазию у преждевременно рожденных детей, страдающих от младенческих нарушений дыхательной системы.

В моделях с щенками гончей собаки было отмечено, что инъекция ДВО уменьшает частоту внутрижелудочных кровоизлияний головного мозга с последующим снижением кровяного давления.

ДВО улучшает состояние крыс, страдающих гепатитом.

Острое сильное увеличение кровяного давления приводит к функциональным и морфологическим нарушениям в артериолах головного мозга. Ингибиторы синтеза простагландинов и дисмутаза высших окислов предназначены для защиты против таких нарушений. Детальный анализ этой модели приводит к заключению, что радикалы высших окислов образуются в качестве побочных продуктов в процессе синтеза простагландинов. Эти результаты наводят на мысль, что повреждение тканей, вызванное радикалами высших окислов, которые высвобождаются в процессе синтеза простагландинов, может иметь место в других патологических ситуациях, и что ДВО может осуществлять защитное действие.

При различных типах аутоиммунных заболеваний таких, как системный склероз и ревматический артрит, была отмечена более высокая частота хромосомных повреждений в лимфоцитах. Фибробластные культуры и прямые препараты костного мозга также иногда обладают более высокой частотой повреждений.

Неопластическая трансформация клеток в общем случае разбивается на две фазы, а именно, на инициирование и последующее развитие. В лабораторных моделях, когда инициирование осуществляли при помощи ионизирующего излучения, блеомицина, мизонидазола и других нитроимидазолов, онкогенную трансформацию эффективно ингибируют при помощи введения в среду ДВО. Причем нет необходимости в присутствии ДВО в процессе воздействия иницирующих материалов, что видимо указывает на то, что фермент ингибирует последующую стадию развития. Нетоксичные дозы ксантина + оксидазы ксантина вызывают рост клеток. Добавление ДВО или ДВО + каталазы ингибирует этот эффект. В модели, в которой кожные опухоли вызывали бензантраценом с последующим применением форболового сложного эфира (ТРА), при помощи локальной обработки липофильным комплексом меди с ДВО-активностью значительно снижали образование опухоли. Этот результат указывает на то, что по крайней мере в некоторых случаях радикалы высших окислов участвуют в образовании опухоли и что ДВО может осуществлять защиту против такого действия.

Есть основания предполагать, что кислородные радикалы участвуют в неблагоприятных воздействиях токсичных материалов таких, как блеомицин, адриамицин, аллоксан, 6-гидродопамин, паракват, дигидрофумаровая кислота, нитрофурантоин и стрептозотоцин. В тех случаях, когда образование радикалов имеет место во внеклеточном пространстве, это пространство может быть защищено при помощи инъекции защитного фермента. Так ДВО может защищать против диабетогенной активности аллоксана в лабораторных условиях и в живом организме. Таким образом, разрушающее воздействие аллоксана, видимо, осуществляется через воздействие радикалов высших окислов или других кислородных радикалов, полученных из него. Причина высокой чувствительности β -клеток к аллоксану не совсем ясна и можно только предполагать, что имеется какая-либо связь между чувствительностью к аллоксану и тяжестью заболевания сахарным диабетом (инсулинового типа). При сахарном диабете существуют инфильтрация в островках Лагерганса под воздействием воспаленных клеток, которые потенциально могут образовывать кислородные радикалы. Поэтому можно подположить, что защита β -клеток при по-

мощи инъекций ДВО является первым шагом в борьбе с сахарным диабетом.

В общем случае CuZn-ДВО использовали в качестве испытываемого материала в экспериментах, которые были описаны выше. Однако можно предположить, что ВК-ДВО можно использовать для тех же целей. Ранее было установлено, что ее можно использовать с более высокой эффективностью благодаря ее специфичным свойствам, которые делают ВК-ДВО особенно притягательной для внеклеточного применения.

Пример 1. Получение гомогенатов пупочного канатика.

Человеческие пупочные канатики собирали в палате для рожениц в госпитале Университета в Умеа. Их хранили в холодильнике в палате, а затем быстро замораживали в лаборатории при температуре -80°C и хранили при температуре -30°C .

После оттаивания пупочные канатики измельчали, суспендировали в 50 мл буфера фосфата калия, pH 7,4, содержащего 0,3 М КВч, 3 мМ диэтилтриаминпентауксусной кислоты (ДТПК), 100000 м·ед/д тразилола (апротинина) и 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ). Использовали 4 л буфера на кг пупочных канатиков. Для увеличения экстрагирования ВК-ДВО из ткани (примерно в 3 раза) использовали хаотропную увеличивающую диффузию соль КВч, ДТПК, тразилол и ФМСФ добавляли с тем, чтобы ингибировать протеазы. Эту суспензию в дальнейшем подвергали гомогенизации, обрабатывали ультразвуком, встряхивали при температуре 4°C в течение 1 часа. Полученные в результате гомогенаты подвергали центрифугированию (6000xg, 20 мин), а верхние слои быстро замораживали при температуре -80°C , хранили при температуре -30°C .

Пример 2. Получение и очистка ВК-ДВО легких человека.

Извлекали легкие человека в течение 24 ч после смерти при помощи вскрытия девяти трупов без каких-либо очевидных признаков заболевания легких. Легкие измельчали на куски, промывали в 0,15 М растворе NaCl, гомогенизировали в 5 объемах смеси лед-вода, 50 мМ ацетата натрия, pH 5,5. Гомогенат обрабатывали ультразвуком, экстрагировали в течение 30 минут при температуре 4°C и центрифугировали (6000 x g) в течение 20 минут.

Верхний слой адсорбировали на ДЭАЭ-Сефселе, уравновешенной 50 мМ ацетатом натрия, pH 5,50, и элюировали градиентом 0–200 мМ NaCl в ацетатном буфере. Градиентный объем в 10 раз превышал объем колонки.

Активные фракции собирали, разбавляли 1,5 объемами дистиллированной воды и титровали до pH 8,4 с использованием 1М раствора NaOH. Снова адсорбировали на ДЭАЭ-Сефаселе, уравновешенном 175 мМ трис HCl, pH 8,4 (1 объем ионообменного материала на 10 объемов фракции). Далее ДЭАЭ-Сефасел промывали буфером, заполняли им колонну и элюировали 0–200 мМ градиентным раствором NaCl в Трис-буфере.

Собранные фракции концентрировали и подвергали диализу относительно 150 мМ фосфата натрия при pH 6,5. Пробу наносили на колонну (примерно 1 мл геля на 15 мг протеина в пробе) с Фенил-Сефарозой, уравновешенной относительно того же буфера. Эту активность элюировали градиентом 0–0,5 М КВч в 50 мМ фосфата натрия (pH 6,5).

Активные фракции собирали, концентрировали и подвергали диализу против 0,15 М фосфата натрия, pH 6,5. Пробу наносили на колонну из Кон А-Сефарозы, уравновешенной относительно фосфатного буфера, а затем элюировали при помощи 50 мМ α -метил D-маннозида в фосфатном буфере.

Активные фракции концентрировали, наносили на колонну и элюировали в 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5.

Активные фракции со стадии элюирования собирали, концентрировали и наносили на колонну из лектина пшеничных зерен Сефароза (10 мл), уравновешенную при помощи 0,15 М фосфата натрия, pH 6,5. Фермент элюировали 0,45 М N-ацетил-D-глюкозамином в фосфатном буфере.

Активные фракции с описанной выше стадии собирали, концентрировали, подвергали диализу против 0,15 М фосфата натрия, pH 6,5, и наносили на колонну, содержащую голубую Сефарозу КЛ-6Б, уравновешенную при помощи фосфатного буфера. После промывки колонны буфером подавали 10 мМ НАД и 10 мМ НАДФ. После промывки буфером пиридиновых нуклеотидов фермент элюировали 0,9 М КВч в 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5.

Активные фракции из голубой Сефарозы колонны подвергали диализу против 25 мМ фосфата натрия, pH 6,5, и наносили на колонну, с гепарин-Сефарозой, уравновешенную тем же буфером, элюировали 140 мл градиента 0–1,0 М NaCl в фосфатном буфере. Получали три фракции.

Фракция А содержала УФ-абсорбирующий материал, который не связывался с гепарин-Сефарозой. Ее подвергали очистке на колонне с Сефакрил G-300. Пробу элюировали в 25 мМ трис HCl, pH 7,5.

Фракция А, В и С подвергали диализу относительно 25 мМ Трис НСl, рН 7,5, а затем концентрировали до объемов 1 мл на мембранных ультрафильтрах. Фракцию С использовали для получения антител ВК-ДВО в соответствии с описанием, приведенным в помещенном ниже примере.

Пример 3. Кролику подкожным способом вводили 30 μ г ВК-ДВО (фракцию С), вместе с полной добавкой Фрейнда. Далее иммунизацию ускоряли при помощи 5 инъекций 30 μ г ВК-ДВО в неполной добавке Фрейнда с интервалами в один месяц. Через 2 недели после введения последней дозы кролику собирали кровь. IgG-фракцию антисыворотки изолировали при помощи адсорбции и десорбции из материала Протеин-А-Сефароза в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Элюирование осуществляли 0,1 М гликокол-НСl, рН 3,0. Собранный IgG титровали при рН 7,0. После этого IgG подвергали диализу против 0,1 М карбоната натрия (рН 8,3), 0,15 М NaCl (соединяющий буфер).

IgG разбавляли до концентрации 5–8 мг/мл при помощи "соединяющего буфера". Добавляли Сефарозу, активированную CNB, инкубировали при встряхивании в течение ночи при температуре 4°C. Буфер отсасывали из геля и анализировали на оставшийся протеин. В общем случае получали более чем 98% связывание. Гель со связанным IgG блокировали суспензией в 1 М этаноламина в течение ночи при температуре 4°C, промывали "соединяющим буфером", далее 0,1 М ацетата натрия (рН 4,0), 0,5 М NaCl. Гель хранили в "соединяющем буфере" с азидом в качестве антибактериального агента.

100 μ л 50% суспензии анти-ВК-ДВО-Сефарозы добавляли к 0,5 мл ВК-ДВО в "соединяющем буфере". Осуществляли параллельное контрольное инкубирование с использованием 100 μ л 50% суспензии Сефарозы 4В. Растворы встряхивали в течение ночи при температуре 4°C, а затем центрифугировали. Остаточная активность в растворе, обработанном Сефарозой 4В, была равна 2080 ед/мл, а в растворе, обработанном анти-ВК-ДВО-Сефарозой – 720 ед/мл. Используя эти цифры, можно рассчитать, что 1 мл анти-ВК-ДВО-Сефарозного геля связывает 13500 единиц ВК-ДВО (примерно 120 μ г). Эти расчеты использовали для составления плана адсорбции ВК-ДВО из гомогенатов ткани человека.

Пример 4. Иммуноадсорбция ВК-ДВО в анти-ВК-ДВО-Сефарозе.

Приготавливали примерно 10 л экстракта пупочных канатиков в соответствии с примером 1. Содержание ВК-ДВО в экстракте составляло примерно 150 ед/мл. Если гель связывает 13500 ед/мл (см. пример 3), адсорбция всей ВК-ДВО в 10 мл экстракта требовала примерно 110 мл анти-ВК-ДВО-Сефарозы.

Экстракт подвергали центрифугированию (6000х, 30 мин), с тем, чтобы удалить осажденный протеин. Затем в верхний слой добавляли 110 мл анти-ВК-ДВО-Сефарозы, смесь инкубировали в течение ночи при температуре 4°C при перемешивании. Гель отделяли от экстракта на стеклянной воронке, промывали 50 мМ фосфата калия (рН 7,0), 0,5 М NaCl.

Гель упаковывали в хроматографическую колонку, элюирование начинали с 0,5 М фосфата К (рН 7,0), 0,5 М NaCl со скоростью 50 мл/час и фиксировали поглощение в области 280 нм. Элюирование продолжали до достижения очень низких значений при A₂₈₀. Далее ВК-ДВО элюировали линейным градиентом KSCN 0,5–2,5 М в 50 мМ фосфата калия, рН 7,0. Общий объем градиента составлял 500 мл, а элюирование осуществляли со скоростью 30 мл/час. Десорбция ВК-ДВО протекала медленно и элюирование не могло быть ускорено.

Элюирование ВК-ДВО не является полным в конце градиента 2,5 М KSCN, но элюирование не продолжают с тем, чтобы не собирать ВК-ДВО, которая становится слишком денатурированной под действием высокой концентрации KSCN.

Первую активность в градиенте не собирали, так как она содержала слишком большое количество примесей неспецифично связанного протеина (A₂₈₀).

Пример 5. Адсорбция и элюирование из ДЭАЭ-Сефасела.

В собранный элюат из колонны с анти-ВК-ДВО-Сефарозой добавляли 1-аминометилпропанол до конечной концентрации 10 мМ. Раствор титровали до рН 9,0 с использованием 1М NaOH, разбавляли 5 объемами дистиллированной воды. В полученный раствор добавляли 40 мл ДЭАЭ-Сефасела, уравновешенного 50 мМ фосфатом натрия, 0,5 М NaCl, 175 мМ Трис-НСl, рН 9,6.

ВК-ДВО адсорбировали на ДЭАЭ-Сефаселе при перемешивании в течение ночи при температуре 4°C. ДЭАЭ-Сефасел затем собирали на стеклянной воронке, промывали раствором 50 мМ фосфата натрия, рН 6,5, и заполняли им хроматографическую колонку диаметром 2,5 см. Эту колонку сначала элюировали примерно 4 объемами вышеупомянутого буфера. Затем ВК-ДВО элюи-

ровали раствором 50 мМ фосфата натрия (рН 6,5), 0,25 М NaCl. Фракции подвергали диализу против 25 мМ фосфата натрия рН 6,5, и концентрировали до объема 2 мл.

Пример 6. Окончательная очистка ВК-ДВО на гепарин-Сефарозе.

Четыре отдельные порции элюата из ДЭАЭ-Сефасела, полученные в соответствии с описанием, приведенным выше, разделяли одновременно на гепарин-Сефарозе. Растворы фермента, которые должны наноситься на колонну, подвергали диализу против 25 мМ фосфата калия, рН 6,5.

20 мл геля гепарин-Сефароза промывали 25 мМ фосфата калия, рН 6,5, содержащем 1М NaCl, а затем буфером без NaCl. Гепарин-Сефарозу использовали для наполнения хроматографической колонны диаметром 2,5 см, а элюирование начинали с 25 мМ фосфата калия (рН 6,5) со скоростью 15 мл/час. Раствор ВК-ДВО (примерно 10 мл, 800000 единиц) наносили на колонну и наблюдали поглощение при 280 нм. ВК-ДВО элюировали с использованием градиента NaCl от 0 до 1,2 М NaCl. Объем градиента составлял 400 мл. ВК-ДВО элюировали в три пика: один без сродства с гепарином, один с промежуточным сродством и один с высокой степенью сродства. Эти пики соответствуют фракциям А, В и С, описанным в примере 2. После очистки с использованием описанной процедуры почти вся активность имеет тип С, и поэтому был сделан вывод, что он является видимо нативной формой фермента.

Собранная активность составляла 430000 единиц (примерно 4,3 мг). Удельная активность составляла 81100 (ед. на мл/А₂₈₀). Собранная активность составляла примерно 53% от активности, нанесенной на гепарин-Сефарозу.

Пример 7. Аминотерминальная последовательность человеческой ВК-ДВО.

Человеческую ВК-ДВО, полученную в соответствии с описанием, приведенным в предыдущих примерах, анализировали с целью идентификации ее (N-терминальной) аминокислотной последовательности. Было установлено, что последовательность из первых 33 аминокислот имеет следующий вид:

TRP NHR GLY CLU ASP SER ALA GLU
PRO ASN SER ASP SER
ALA GLU TRP ILE ARG ASP MET TYR ALA
LYS VAL THR CLU
ILE TRP GLN GLU VAL MET GLN

Эта последовательность – или ее соответствующая часть – может быть использована для получения синтетических ДНК-зондов, синтетических дезоксиолиго-

нуклеотидов, комплементарных как к кодирующей, так и некодирующей нити ДНК-последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, указанную выше.

Такие зонды могут быть использованы в экспериментах по гибридизации с кДНК-библиотеками, синтезированными по иРНК из ВК-ДВО-продуцирующих клеток или тканей для того, чтобы изолировать кДНК-копию полной длины или часть ВК-ДВО-гена в соответствии с описанием, приведенным в помещенном ниже примере.

Пример 8. Клонирование и формирование последовательности человеческой ВК-ДВО.

Получение ДНК-зонда.

Человеческую ВК-ДВО подвергали очистке из пупочных канатиков в соответствии с описанием примеров 1–6, а последовательность первых 33 N-терминальных аминокислот определяли в соответствии с описанием примера 7. На основе этой аминокислотной последовательности синтезировали 48-мерный диоксиолигонуклеотид:

5'-CAGGGACATGTATGCCAAGGTGACT
GAGATCTGGCAGGAGGTG
ATGCA-3' комплементарный к кодирующей нити ВК-ДВО-гена.

Выделение кДНК плаценты человека. Восемь нитроцеллюлозных фильтров, на которые были помещены 20000 бляшек рекомбинантных фагов, несущих кДНК-библиотеку на каждый фильтр, сначала пропитывали в 5 х КСН, а затем подвергали предварительной гибридизации в течение одного часа при температуре 41°C в 40 мл 20% формамида, 5 х раствор Денхардта, 50 мМ фосфата натрия, рН 6,8 и 50 мкг/мл денатурированной, обработанной ультразвуком, ДНК бычьего тимуса. Далее фильтры гибридизовали с 32р-меченым 48-мерным-зондом, описанным выше. Гибридизацию осуществляли в растворе для предварительной гибридизации, в который добавляли 100 мМ АТФ (конечная концентрация) в течение 18 часов при температуре 41°C. После инкубирования в течение ночи при температуре 41°C фильтры промывали один раз в 0,2 х КСН при температуре 37°C, а затем 4 раза промывали в 0,2 х КСН, 0,1% ДСН при температуре 37°C и сушили на воздухе. Фильтры в течение ночи экспонировали на рентгеновской пленке. На каждом фильтре содержалось примерно 6 положительных бляшек.

Фаги с положительной реакцией гибридизации изолировали и подвергали очистке, а ДНК из этих фагов экстрагировали. Длину

кДНК-вставок определяли при помощи электрофореза в агаровом геле после расщепления ДНК фага эндонуклеазой EcoR1. Рекомбинантный фаг, несущий самую длинную кДНК-вставку, обозначали через λ SP3 и использовали в дальнейших исследованиях.

кДНК-вставку фага λ SP3 подвергали анализу эндонуклеазами и вставляли в ДНКплазмиды р V C18 и M13-вектора mp 9. Вставка из λ SP3 содержала 1396 пар оснований (п.о.) кДНК и открытый для считывания участок, кодирующий протеин из 240 аминокислот, а также нетранслируемую 5'-область в 60 п.о. и нетранслируемую 3'-область в 607 п.о.

Субклонирование и анализ с использованием эндонуклеаз рестрикции кДНК-вставок, кодирующих человеческую ВК-ДВО.

Примерно 30 μ г ДНК λ SP3 переваливали эндонуклеазой EcoR1 и кДНК-вставку отделяли от ДНК λ электрофорезом в 6% полиакриламидном геле. Приблизительно 0,2 μ г кДНК-фрагмента выделяли из геля при помощи электроэлюирования, экстрагирования фенолом и хлорформом, и осаждения этанолом. 0,05 μ г изолированного кДНК-фрагмента лигировали с 1 μ г ДНК Р VC18 по сайту EcoRI. ДНК после лигирования трансформировали в штамм E. Coli HB 101. Трансформированные клетки подвергали селекции на пластинках, содержащих ампициллин. Рекомбинантную плазмиду, несущую кДНК-вставку, идентифицировали и обозначили через pLS3. ДНК плазмиды pLS 3 подвергали анализу при помощи эндонуклеаз.

Анализ ДНК-последовательности кДНК, кодирующей человеческую ВК-ДВО.

Последовательную серию перекрывающихся клонов кДНК-вставки формировали в M13-векторе mp 9, определяли полную нуклеотидную последовательность кДНК, при этом было установлено, что она имеет длину 1396 п.о.

Эта кДНК-вставка имеет открытую для считывания область в 240 аминокислот. Аминокислотная последовательность очищенного зрелого протеина начинается в аминокислоте +1, что наводит на мысль о существовании сигнального пептида из 18 аминокислот. Подобно известным сигнальным пептидам, эта последовательность аминокислот богата гидрофобными аминокислотами и, кроме того, последним остатком является аланин, который является одной из аминокислот, обнаруженной в этой позиции в известных сигнальных пептидах. Аминокислотные последовательно-

сти были идентифицированы при помощи анализа пептидной последовательности.

Еще одним отличительным свойством ДНЕ-последовательности является последовательность, обнаруженная в кодоне начала трансляции, == CAGCCAUGC -, которая гомологична последовательности для эукариотных свойств начала, CCACC-AVG/G/. Кроме того, возможный сигнал полиаденилирования с последовательностью -ATTAAG-, гомологичной постулированной согласованной последовательности AATAAA, обнаружен через 14 п.о. в направлении вверх от конца полиаденилирования.

Экспрессия человеческой ВК-ДВО в клетках CHO.

Вектор экспрессии, содержащий начало репликации, ранний и поздний промоторы, последовательности полиаденилирования и окончания Вируса Обезьяны 40 (SV 40) использовали для продуцирования человеческой ВК-ДВО, закодированной в кДНК, описанной выше. кДНК длиной 1396 п.о. вставляли в единственный сайт EcoRI, расположенный между ранним промотором SV 40 и последовательностями полиаденилирования и окончания SV 40 так, что экспрессия кодирующей последовательности человеческой ВК-ДВО управляется ранним промотором SV 40. Сконструированную таким образом плазмиду экспрессии ВК-ДВО обозначали как pPS3.

20 μ г ДНК pPS3 расщепляли эндонуклеазой Pst1 в единственном сайте, расположенном в гене β -лактамазы. Линеаризованную ДНК pPS3 подвергали трансфекции вместе с 0,5 μ г ДНК из плазмиды, содержащей последовательности, отвечающие за устойчивость к Генитицину (Г-418 сульфат), в клетках CHO-K1 (ATCC CC 61). Клетки после трансфекции подвергали селекции при помощи выращивания в среде (среда Ф12 Хэмса, дополненная 10% сывороткой плода теленка, стрептомицином и пенициллином), содержащий 700 μ г на мл Генитицина. Колонии, устойчивые к Генитицину, изолировали и размножали в той же среде. Среду извлекали в определенные промежутки времени и анализировали на присутствие ВК-ДВО при помощи ЭЛИСА, а активность фермента измеряли в соответствии с описанием, приведенным ниже.

Одну из полученных линий клеток обозначили через CHO-K1/pPS3 Знео-18 и отбирали для последующих исследований.

Секретирование ВК-ДВО в культуральную среду клетками CHO, содержащими ген, кодирующий человеческую ВК-ДВО.

Клон СНО-K1/pPS3-нео-18 и родительские клетки СНО-K1 выращивали в среде Ф-12 Хэма, содержащей 10% сыворотку плода телят. Спустя три дня среду удаляли, а клетки дважды промывали, инкубировали в растворе, содержащем 40 мМ трис-НСI, 140 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА. Извлеченные клетки (примерно 8×10^5) центрифугировали, верхний слой декантировали, а клетки хранили при температуре -80°C в виде осадка. Клетки разрушали ультразвуком в 1,5 мл раствора, содержащего 50 мМ фосфата К, pH 7,4, 0,3 М КВ, 3 мМ ДТПА, 0,5 мМ ФМСФ и 100 ед/мл тразилола. Гомогенаты центрифугировали. Специальное определение количества ВК-ДВО проводили при помощи инкубирования гомогенатов и культуральной среды с иммобилизованными антителами относительно человеческой ВК-ДВО и человеческой CuZn ДВО. Никаких следов ВК-ДВО не было обнаружено в родительских клетках СНО K1 или в их культуральной среде. Было установлено, что культуральная среда после клона клеток СНО-K1/pPS Знео-18 (15 мл) в этом конкретном эксперименте содержит 51 ед/мл ВК-ДВО, а всего 765 ед. Гомогенат клеток (в 1,5 мл) содержит 71 ед. ДВО-активности, из которой 20 ед. относится к ВК-ДВО. Таким образом, 97,5% ВК-ДВО в культуре СНО-K1/pPS Знео-18 секретировано в среду.

Продуцирование человеческой ВК-ДВО в клетках СНО.

Продуцирование человеческой ВК-ДВО этим клоном в случае, когда клетки выращивали на твердом носителе и в суспензии.

1. Продуцирование ВК-ДВО клетками СНО-K1/pPS Знео-18, выращиваемыми на твердых носителях.

а) В колбу емкостью 175 мл прививали $4,5 \times 10^6$ клеток в 30 мл среды Ф12 Хэма с 10% бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, стрептомицин и пенициллин. Клетки инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Среда меняли каждые три дня, а концентрацию человеческой ВК-ДВО, секретированной в среду, определяли. Производительность человеческой ВК-ДВО составляла $1,5 \text{ пг} \cdot \text{клетку}^{-1} \cdot 24 \text{ часа}^{-1}$, что устанавливали при помощи ИФА и определения активности фермента ВК-ДВО.

б) На микроносители 4 мг/мл прививали клетки в среде Ф12 Хэма, в которую добавляли 5% сыворотку плода телят, 2 мМ L-глутамин, стрептомицин и пенициллин.

Клетки выращивали в колбе с мешалкой емкостью 500 мл при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 . При выращивании слившихся клеток культуру заменяли со скоростью 0,088 час $^{-1}$.

Производительность человеческой ВК-ДВО составляла $0,50 \text{ пг} \cdot \text{клетку}^{-1} \cdot 24 \text{ часа}^{-1}$.

2. Продуцирование ВК-ДВО клетками СНО-K1/pPS Знео-18, выращиваемыми в суспензионной культуре.

На среду объемом 125 мл (среда Ф12 Хэма, в которую добавляли 10% сыворотки плода телят, 2 мМ L-глутамин, стрептомицин и пенициллин) прививали 2×10^5 клеток/мл. Эту культуру инкубировали во вращающейся колбе при температуре 37°C в воздухе, содержащем 5% CO_2 .

Каждые три дня среду заменяли. Производительность человеческой ВК-ДВО составила $0,65 \text{ пг} \cdot \text{клетку}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

Анализ на обнаружение экспрессии человеческой ВК-ДВО.

1. Анализ с иммуноадсорбентом, связывающим фермент (ИФА). На микротитровальные пластины наносили 100 $\mu\text{л}$ на углубление раствор, содержащий 15 $\mu\text{г}$ на мл поликлональных антител JgG кролика анти-ВК-ДВО (пример 3) в 15 мМ Na_2CO_3 , 35 мМ NaHCO_3 , 0,02% N_2N_3 , pH 9,6. После инкубирования в течение ночи при комнатной температуре пластины промывали буфером ПБС (10 мМ фосфата натрия, 145 мМ NaCl, pH 7,2), инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C , вносили 200 $\mu\text{л}$ на углубление раствора, содержащего 3% (в/о) альбумина бычьей сыворотки в ПБС и промывали в ПБС. Пробы в 100 $\mu\text{л}$ разбавленной среды добавили в каждое углубление и инкубировали в течение 1 ч при 37°C . Пластины промывали 1 ч при 37°C с 100 $\mu\text{л}$ на углубление раствора, содержащего 8 $\mu\text{г}$ на мл моноклонального антитела мыши анти-ВК-ДВО в 3% альбумине бычьей сыворотки в ПБС. После промывки 5% Твином 20 в ПБС пластины инкубировали в течение 1 ч при 37°C с конъюгированными пероксидазой антителами кролика анти-мыши в 3% альбумине бычьей сыворотки в ПБС. Пластины промывали 5% Твином 20 в ПБС и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте с 100 $\mu\text{л}$ на углубление раствора субстрата (50 мМ цитрата натрия, 100 мМ фосфата натрия, 0,04% (в/о) о-фенилен диамина, 0,01% H_2O_2 , pH 5,0). Реакцию прекращали добавлением 25 $\mu\text{л}$ 10% ДСН на углубление и измеряли поглощение в области 450 нм.

2. Определение активности фермента ВК-ДВО.

Пробы анализировали перед и после их обработки анти-человеческой ВК-ДВО, иммобилизованной на Сефарозе (пример 4). В качестве активности ВК-ДВО брали раз-

ность между активностью пробы перед и после адсорбции антителами.

Пример 9. Индуцированное гепарином высвобождение ВК-ДВО в плазме крови человека.

200 ед./кг веса тела гепарина инъекцировали двум здоровым мужчинам, голодавшим в течение ночи (а) в возрасте 34 лет и (б) в возрасте 40 лет. Пробы крови брали перед инъекцией гепарина и с равными интервалами после инъекции. Пробы крови вводили в вакуумные трубки типа Терумо Веноджект, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта, и затем подвергали центрифугированию. После центрифугирования пробы плазмы хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

Кроме того, 20 мл цельной крови брали у трех здоровых человек и хранили в трубке с ЭДТА, как это было описано выше. Эту кровь делили на две равные части и в одну из них добавляли 30 ед. гепарина/мл, а в другую равный объем 0,15 М NaCl. После инкубирования в течение 30 минут при комнатной температуре пробу подвергали центрифугированию и плазму собирали для ДВО-анализа.

ДВО-активность анализировали при помощи прямого спектрофотометрического метода с использованием KO_2 . Одна единица ДВО-активности соответствует 8,3 нг человеческой CuZn ДВО, 8,8 нг человеческой ВК-ДВО и 65 нг бычьей Mn-ДВО. Отличия между изоферментами в плазме усиливают при помощи антител относительно человеческой CuZn ДВО и ВК-ДВО, иммобилизованных на Сефарозе 4Б.

Внутривенная инъекция 200 ед. гепарина на кг веса тела приводит к быстрому трехкратному увеличению ВК-ДВО-активности в плазме. Максимальное увеличение получали спустя 5 минут. Активность остается высокой в течение 15-30 минут, а затем постепенно снижается и достигает первоначального уровня через 6 часов. Введенный внутривенным способом гепарин не оказывал никакого влияния на активность CuZn ДВО плазмы и на активность ДВО устойчивости к цианиду. Возрастающие дозы гепарина приводят к увеличению высвобождения ВК-ДВО.

Вопреки результатам, полученным в живом организме, добавление гепарина в цельную кровь, не оказывало какого-либо влияния на активность ВК-ДВО в плазме. Даже добавление гепарина (5 ед./мл) непосредственно в плазму не приводило к каким-либо изменениям в активности ВК-ДВО. Эти результаты указывают на то, что увеличение активности ВК-ДВО в плазме живого

организма не связано с каким-либо высвобождением фермента из кровяных клеток или активацией ВК-ДВО, содержащейся в плазме.

5 Пробы плазмы 5 здоровых людей (3 мужчины, 2 женщины) подвергали хроматографическому анализу на гепарине-Сефарозе при комнатной температуре в колоннах, содержащих 2 мл гепарина-Сефарозы с 25 мМ фосфата калия, pH 6,5, в качестве элюента. 10 Пробы (2 мл плазмы) вводили со скоростью 4,2 мл/час, а когда A_{280} достигал координатной оси, граничные компоненты элюировали при помощи линейного NaCl-градиента в 15 буфере фосфата калия (0-1 М, общий объем 50 мл) со скоростью 9 мл/час. Средний выход ДВО-активности в элюате составил примерно 95%.

20 Перед нанесением пробы плазму уравновешивали буфером элюирования с целью хроматографии на небольших колоннах типа Сефадекс Г 15. Хроматография приводила к трехкратному разбавлению проб. Извлечение ДВО-активности было близко к 25 100%.

Результаты определения фракций А, В и С ВК-ДВО в пяти видах нормальной плазмы приведены в табл. 1, помещенной ниже. Было установлено, что эти три фракции приблизительно составляют равные части в 30 нормальной плазме. Средний выход ВК-ДВО-активности на хроматограмме составлял 95%. Разделение на три фракции очевидно не происходит за счет вторичного 35 разрушения в лабораторных условиях, так как структуры для каждого типа плазмы одинаковы как перед, так и после хранения в течение 3 дней в холодильнике. Внутривенная инъекция гепарина пациенту приводит 40 к существенному увеличению только фракции С. Фракции А и В остаются без изменений. У второго испытываемого пациента (эти данные не приведены) влияние инъекции гепарина было по существу идентичным. 45 Фракция С увеличивалась от 7 до 32 единиц/мл плазмы.

Эксперименты, описанные выше, показывают, что внутривенная инъекция гепарина приводит к быстрому увеличению 50 ВК-ДВО-активности в плазме. Гепарин не активизирует ВК-ДВО, поэтому никакое высвобождение из клеток крови не может быть доказано, а это наводит на мысль, что поверхности клеток эндотелия являются наиболее вероятным источником высвобожденной ВК-ДВО. Несколько других факторов, имеющих сродство с гепарином, липопротеиновая липаза, печеночная липаза, диамин оксидаза и тромбоцитный фактор 4 ранее были подвергнуты аналогичному анализу и

было установлено, что при помощи внутривенной инъекции гепарина наблюдается их быстрое высвобождение. В большинстве этих случаев ясно, что индуцированное гепарином вытеснение протеина из сульфата гепарина на поверхности клеток эндотелия является объяснением этого явления. Весьма правдоподобно, что высвобождение ВК-ДВО можно объяснить теми же эффектами.

Никаких пиков в высвобождении не было получено при введении гепарина в дозах до 200 ед/кг веса тела, это показывает, что для максимального высвобождения ВК-ДВО необходимо больше гепарина, чем для липопротеиновой липазы, диамин оксидазы, печеночной липазы и тромбоцитного фактора 4. Отношение между средством для гепарина с сульфатом гепарина может быть ниже для ВК-ДВО, чем для других протеинов.

Основная плазма человека содержит почти равные количества фракций, А, В и С ВК-ДВО. Внутривенная инъекция гепарина приводит к высвобождению только фракции С с высоким сродством к гепарину, которая, очевидно, является формой, имеющей сродство к поверхностям клеток эндотелия. Здесь достигали 4–6-кратное увеличение, но весьма правдоподобно, что более высокие дозы гепарина приводили бы к более высоким пропорциям. Намного более высокие пропорции достигали для липопротеиновой липазы, печеночной липазы, диамин оксидазы и тромбоцитного фактора 4. По сравнению с этим протеинами эндотелиальное связывание ВК-ДВО оказывалось намного слабее. Видимо, для фракции С ВК-ДВО имеется равновесие между плазмой и поверхностями клеток эндотелия. Большая часть ВК-ДВО в сосудистой системе оказывается расположенной на поверхностях клеток эндотелия.

Молекулярные основы отличия относительно сродства с гепарином между фракциями А, В и С ВК-ДВО пока не установлены. Аминокислотный и более подробный составы отличаются не очень сильно. Нельзя было также обнаружить каких-либо антигенных различий. Связывание с отрицательно заряженным гепарином, очевидно, не носит общей ионообменной природы, так как никаких различий между фракцией А и С не обнаружено при помощи ионообменной хроматографии и, кроме того, их изоэлектрические точки идентичны (рН 4,5).

Большинство типов клеток организма содержит сульфат гепарина и другие сульфатированные глюкозаминогликаны на своих поверхностях. Возможно, что большая часть ВК-ДВО, содержащейся в тканях,

расположена на субстанциях клеточных мембран и соединительной ткани.

Пример 10. Инъекции 125I-меченой человеческой ВК-ДВО кроликам

ВК-ДВО пупочных канатиков метили иодом-125. Локализацию обнаруживали на хроматограмме в том же месте, что и для немеченой ВК-ДВО; этот факт показывает, что молекулярный размер не менялся.

Полученную в результате меченую ВК-ДВО подвергали хроматографии на гепарине-Сефарозе. Для последующих экспериментов использовали только материал, обладающий высоким сродством к гепарину.

Меченую ВК-ДВО вводили внутривенным способом кроликам, брали пробы крови с тем, чтобы определить радиоактивность, оставшуюся в плазме. Пробы плазмы осаждали с использованием трихлоруксусной кислоты, а радиоактивность определяли в протеиновых осадках, которые получали центрифугированием. Кроликам давали иодид в воду для питья с тем, чтобы предотвратить повторное введение метки в протеины в живом организме.

С тем, чтобы изучить действие гепарина, через различные промежутки времени кроликам вводили внутривенным способом гепарин (2500 ед.), 100% соответствует радиоактивности, которое плазма должна теоретически содержать при предположении, что общий объем плазмы у кроликов составляет 5% от их общего веса (например, кролик весом 3 кг содержит 150 мл плазмы).

После инъекции меченой ВК-ДВО обнаруживается быстрое снижение активности в течение 5–10 минут на примерно 15% от теоретического максимума. Когда делали инъекцию гепарина до введения ВК-ДВО, то почти вся ВК-ДВО активность сохранялась, имело место только медленное ее снижение. Когда гепарин вводили спустя 2, 5, 10 и 20 минут после введения 125I-ВК-ДВО, то имело место быстрое увеличение радиоактивности и в области пика достигался теоретический максимум.

Пример 11. Анализ нативной ВК-ДВО пупочных канатиков и рекомбинантной ВК-ДВО на гепарине-Сефарозе.

Примерно 500 единиц (4,4 мкг) нативной ВК-ДВО С и рекомбинантной ВК-ДВО подвергали хроматографии на гепарине-Сефарозе, как это описано в примере 9. Было установлено, что оба фермента элюируются при 0,52 М в градиенте NaCl. Таким образом, нативная и рекомбинантная ВК-ДВО ведут себя идентично и этот результат показывает, что рекомбинантная ВК-ДВО имеет С-тип.

Пример 12. Содержание меди и цинка в молекуле ВК-ДВО.

Содержание меди и цинка в нативной ВК-ДВО пупочных канатиков и рекомбинантной ВК-ДВО определяли при помощи методов атомной спектроскопии поглощения в графитной горелке на установке Перкин-Элмер Химан 303 + ХГА. Сравнивали количество протеина ВК-ДВО, меди и цинка в препаратах. Было установлено, что один моль нативной ВК-ДВО (тетрамера) содержит 3,97 моля меди и 4,50 моля цинка. Рекомбинантная ВК-ДВО содержит 3,98 моля меди и 4,45 моля цинка на моль фермента. Результаты подтверждают, что молекула ВК-ДВО содержит четыре атома цинка.

Пример 13. Получение моноклональных антител против человеческой ВК-ДВО.

Мышам делали инъекции ВК-ДВО С, полученной из пупочных канатиков (примеры 4-6). Спустя несколько месяцев, мышам делали инъекции ВК-ДВО три дня подряд. На четвертый день селезенки удаляли и измельчали. Клетки селезенки сливали с линией клеток миеломы в соответствии со стандартными приемами. Клоны, продуцирующие анти-ВК-ДВО, идентифицировали посредством техники ИФА, а затем подвергали субклонированию. Чтобы получить антитела в больших количествах клоны "14, В7" и "6, Н6" выращивали в брюшной полости мыши. Антитела изолировали из асцитной жидкости при помощи адсорбции из Протеина А-Сефарозы.

Пример 14. Иммунизация моноклональной анги-ВК-ДВО на CN В3-активированной Сефарозе.

"6, Н6" моноклональное антитело связывает н-ВК-ДВО очень прочно ($K_D < 10^{12}$ М). Антитело "14, В7" ($K_D \sim 10^9$ М) выбрали для очистки ВК-ДВО. Перед связыванием с CNBr - активированной Сефарозой азид в 1 gG растворе должен быть удален, а буфер должен быть заменен на "соединяющий буфер" (0,1 М карбоната натрия, pH 8,3, 0,5 М NaCl). Эту стадию осуществляли на клонне типа ПД10. CNBr - активированной Сефарозе давали возможность разбухнуть, добавляли в раствор IgG (в соединяющем буфере) в количестве 2 мг IgG на мл геля, инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 2 часов на "вибраторе". Буфер удаляли и анализировали на оставшийся протеин. Было получено более 97% связывание. Оставшиеся активные группы на IgG - связывающем геле блокировали 1М этаноламином при pH 9,3 в течение 2 ч при комнатной температуре. Избыток этаноламина и адсорбированный протеин смывали попеременно "соединяющим буфером" и 0,1 М

ацетатом натрия, pH 4,0, 0,5 М NaCl, и так четыре-пять раз. Гель хранили в растворе 50 mM фосфата калия, pH 7,4, 0,5 М NaCl - 0,02% N_2N_3 . Максимальную связывающую способность моноклональной IgG-Сефарозы определяли инкубированием в течение 3 ч в избытке очищенной ВК-ДВО и последующего анализа оставшейся ВК-ДВО-активности в верхнем слое после центрифугирования. Этот результат сравнивали с аналогичным инкубированием с использованием Сефарозы 4В.

В 1 мл ВК-ДВО в "соединяющем буфере" добавляли 10, 50, 100 и 1000 μ л 50% суспензии моноклональной анти-ВК-ДВО-Сефарозы, инкубировали в том же буфере 80% суспензии Сефарозы ХБ при комнатной температуре в течение 3 часов, центрифугировали, оставшиеся ВК-ДВО-активности определяли в верхнем слое. Используя полученные цифры, можно рассчитать, что связывающая ВК-ДВО способность геля составляет примерно 6000 единиц ВК-ДВО на мл 50% суспензии геля (~ 12000 ед/мл геля). Эта цифра равна примерно 6% теоретической максимальной связывающей способности и близка к той, которую в общем случае достигаются при использовании случайно связанного IgG.

Пример 15. Изоляция рекомбинантной ВК-ДВО при использовании на начальной стадии моноклональной анти-ВК-ДВО-Сефарозы

Процедуру очистки целиком осуществляли при температуре $+4^\circ\text{C}$. 1 литр среды из культуры клеток CHO-K1/pPSneo-18, содержащей 300 единиц ВК-ДВО-активности ($\sim 2,6 \mu\text{g}$) на мл, центрифугируют с тем, чтобы удалить любые клеточные осколки и осадки. С тем, чтобы связать ВК-ДВО в среде (~ 1500000 единиц), использовали примерно 125 мл моноклональной анти-ВК-ДВО-Сефарозы. IgG-Сефарозой заполняли хроматографическую колонну диаметром 5 см и высотой примерно 6,5 см. Колонну промывали раствором 50 mM фосфата натрия, 0,5 М NaCl, pH 7,0, перед "нанесением пробы". Культуральную среду наносили на колонну и наблюдали поглощение в области 280 нм. Протеины, слабо связанные с IgG-Сефарозой, элюировали раствором 50 mM фосфата натрия, pH 6,5, 0,5 М NaCl. Далее колонну промывали 650 мл 50 mM АМП (1-аминометил-пропанол-НCl, pH 9,0), а ВК-ДВО элюировали 50 mM АМП-НCl, pH 9,0, 1 М KSCN, собирали ВК-ДВО-активность. На следующей стадии всю порцию разбавляли 14 объемами дистиллированной воды и титровали до pH 8,5 с ис-

пользованием 2 М АМП. Извлечение на стадии IgG – сродство составляло 60%.

10 мл ДЭАЭ-Сефасела промывали 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, упаковывали в хроматографическую колонну (0,5x5). Разбавленную порцию ВК-ДВО из IgG – колонны наносили на ДЭАЭ-Сефасел, колонну промывали раствором 50 мМ фосфата натрия, pH 8,5, до тех пор, пока поглощение в области 280 нм не станет близким к нулю. Элюцию проводили раствором 50 мМ фосфата натрия, pH 8,5, 0,25 М NaCl. Фракции собирали, подвергали диализу против 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, концентрировали до объема 6 мл. Выход на этой стадии составил 100%.

ВК-ДВО подвергали очистке на гепарине-Сефарозе. 12 мл гепарина-Сефарозы подготавливали и промывали 5 мМ фосфатом натрия, pH 6,5, 1 М NaCl, а затем 50 мМ фосфатом натрия, pH 6,5 и заполняли колонну. Концентрированную и отдиализованную фракцию (6 мл с ВК-ДВО-активностью примерно 185000 ед/мл) наносили на колонну, наблюдали поглощение в области 280 нм. Элюирование начинали с 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, когда поглощение в области 280 нм приближалось к координатной оси, ВК-ДВО элюировали градиентом NaCl от 0 М до 1 М. Объем градиента составлял 270 мл. Для того, чтобы защитить ВК-ДВО от воздействия высокой NaCl концентрации, фракции разбавляли (с начала подачи градиента) дистиллированной водой. Т-трубку вставляли в пластиковую трубу из выходного конца колонны и дистиллированную воду закачивали в элюирующую жидкость с объемной скоростью, превышающей в два раза скорость элюирования колонны.

ВК-ДВО-активность элюировали при той же концентрации NaCl, что и С-пик в примере 6. В центре этого пика элюат собирали (порция 1). Удельная активность порции 1 (ед/мл разделенное на A_{D280}) составила 88400. Удельная активность нативной ВК-ДВО, полученной из гомогената пупочного канатика (см. пример 1) при помощи такой же процедуры, составила 88200.

Пример 16. Определение молекулярного размера нативной ВК-ДВО и рекомбинантной ВК-ДВО при помощи гелевой хроматографии.

Молекулярный вес нативного фермента из пупочных канатиков и рекомбинантного фермента оценивали при помощи гель-хроматографии на Сефакрил С-300. Калибровку колонны проводили при помощи ферритина (440000), IgG (150000), альбумина бычьей сыворотки (76000), яичного альбумина (43000), химотрипсिनогена (25000) и рибонуклеазы

(13700) (молекулярные веса указаны в скобках).

Нативную и рекомбинантную ВК-ДВО элюировали из колонны в положениях, соответствующих мол. м. 136000 и 151000, соответственно. Таким образом, рекомбинантная ВК-ДВО оказалась несколько больше. Часть такого отличия может быть вызвана частичной деградацией субблоков нативного фермента, как это можно видеть в ДВО-ПАГЕ-экспериментах, описанных ниже (пример 17).

Пример 17. Анализ нативной ВК-ДВО пупочных канатиков и рекомбинантной ВК-ДВО электрофорезом в градиентном полиакриламидном геле.

25 мкг каждого фермента сушили вымораживанием, растворяли в 50 мкг смеси пробы, содержащей 5% сахарозы, 5 мМ ЭДТА, 5% 2-меркаптоэтанола и 2% ДСН в буфере, состоящем из 0,4 М борной кислоты и 0,41 М Трис, pH 8,64. Пробы кипятили 5 мин и сразу же охлаждали на льду. 1 мкл (примерно 0,2 мкг) каждой пробы наносили на градиентный (10–15%) полиакриламидный гель и разгоняли в электрическом поле, окрашивали в Кумаси. Рекомбинантная ВК-ДВО имеет одну полосу с мол. м. примерно 32000. Нативная ВК-ДВО имеет две полосы, та, что больше, имеет очевидно тот же молекулярный вес, что и рекомбинантная ВК-ДВО, а та, что меньше, имеет мол. м. примерно 28000, что, вероятно, вызвано частичной деградацией фермента.

Пример 18. Сравнение между аминокислотным составом нативной и рекомбинантной ВК-ДВО и аминокислотная последовательность, полученная из кДНК-последовательности, кодирующей ВК-ДВО.

Аминокислотный состав нативной ВК-ДВО пупочных канатиков и рекомбинантной ВК-ДВО (триптофан не включен в это сравнение, так как он не может быть надежно получен в аминокислотном анализаторе) показал, что нативный и рекомбинантный ферменты почти идентичны по своему составу. Совпадение с числовыми данными, полученными из кДНК-последовательности, также очень хорошее. Эти результаты указывают на то, что нативный и рекомбинантный ферменты в сущности идентичны и что аминокислотная последовательность, полученная из кДНК-последовательности, является правильной.

Формула изобретения

Способ получения внеклеточной перекисной дисмутазы человека, заключающийся в том, что конструируют рекомбинантную плазмидную ДНК pPS3-нео 18, содержа-

щую фрагмент ДНК, кодирующий внекле- точную пимптазу высших окислов, и харак-

теризующуюся следующей нуклеотидной последовательностью

TrpThrGlyGluAspSerAlaGluProAsnSerAspSerAlaGluTrpIleArgAspMet
TGGACGGGCGAGGACTCGGCCGAGCCCAACTCTGACTCGGCCGAGTGGATCCGAGACATG
ACCTGCCCGCTCCTGAGCCGCTCGGGTTGAGACTGAGCCGCTCACCTAAGCTCTGTAC

30

40

TyrAlaLysValThrGluIleTrpGlnGluValMetGlnArgArgAspAspAspGlyThr
TACGCCAAGGTACGGAGATCTGGCAGGAGGTCATGCAGCCGCGGGACGACGACGGCAGG
ATGGCGTTCCAGTGCCTCTAGACCGTCTCCAGTACGTTCGCCGCTGCTGCTGCCGCTGC

50

60

LeuHisAlaAlaCysGlnValGlnProSerAlaThrLeuAspAlaAlaGlnProArgVal
CTCCACGCGCCCTGCCAAGTGCAGCCGTCGGCCACGCTGGACGCGCGCAAGCCCGGCTG
GAGGTCCGGCGGACGGTCCACGTTCGGCAGCCGTCGACCTGCGGCGCGTCCGGGGCCAC

70

80

ThrGlyValValLeuPheArgGlnLeuAlaProArgAlaLysLeuAspAlaPhePheAla
ACCGGCGTCTCTCTTCCGGCAGCTTGGCCCGCGCCCAAGCTCGACGCTTCTTCGGC
TGGCCGAGCAGGAGAAGCCGTCGAACCGGGGCGGGTTCGAGCTGCGGAAGAAGCGG

90

100

LeuGluGlyPheProThrGluProAsnSerSerSerArgAlaIleHisValHisGlnPhe
CTGGAGGGCTTCCCGACCCGAGCCGAACAGCTCCAGCCGCGCCATCCACGTGCACCAGTTC
GACCTCCCGAAGGCTGGCTCGGCTTGTTCGAGGTTCGGCGCGGTAGGTGCACGTGGTCAAG

110

120

GlyAspLeuSerGlnGlyCysGluSerThrGlyProHisTyrAsnProLeuAlaValPro
GGGACCTGAGCCAGGGCTCCGAGTCCACCGGCCCCACTACAACCCGCTGGCCGTGCCG
CCCCTGGACTCGGTCCCGACGCTCAGGTGGCCCGGGGTGATGTTGGGCGACCGGCACGGC

130

140

HisProGlnHisProGlyAspPheGlyAsnPheAlaValArgAspGlySerLeuTrpArg
CACCCGACGACCCCGGGGCACTTCGGCAACTTCGGGTCGCGGACGGCAGCCCTCTGGAGG
GTGGGCGTTCGTGGGCGCGCTGAAGCCGTTGAAGCGCCAGGTCGCTGCGGTCGGAGACCTCC

150

160

TyrArgAlaGlyLeuAlaAlaSerLeuAlaGlyProHisSerIleValGlyArgAlaVal
TACCGCGCCGCGCTGGCCGCTCGCTCGCGGGCCCGCACTCCATCGTGGGCGGGCCGCTG
ATGGCGCGCCCGACCGGCGGAGCGGCCCCGGGCGTGAGGTAGCACCCGGCCCGGCAC

160 V

170

ValValValHisAlaGlyGluAspAspLeuGlyArgGlyGlyAsnGlnAlaSerValGlu
GTGGTCTCCACGCTGGCGAGGACGACCTGGGCCGCGGCGGCAACCAGGCCAGCGTGGAG
CACCAGCAGGTGCGACCGCTCCTGCTGGACCCGGCGCCCGCTTGGTCCGGTCCGCACCTC

180

190

AsnGlyAsnAlaGlyArgArgLeuAlaCysCysValValGlyValCysGlyProGlyLeu
AACGGGAACCGGGCCGGCGGCTGGCCTGCTGCGTGGTGGGCGTGTGCGGCCCCGGGCTC
TTGCCCTTGGCCCCGGCCCGGACCGGACGACGCACCACCCGCACAGCCCCGGGCCGAG

720

200

210

TrpGluArgGlnAlaArgGluHisSerGluArgLysLysArgArgArgGluSerGluCys
TGGGAGCGCCAGGCGCGGGAGCACTCAGAGCGCAAGAAGCGGCGGCGGAGAGCGAGTGC
ACCCTCGCGGTCCGCGCCCTCGTGAGTCTCGCGTTCTTCGCCCGCCGCTCTCGCTCAGG

780

220

LysAlaAla***

AAGGCCGCTGAGCGCGGCCCCACCCGGCGGCGGCCAGGGACCCCGAGGCCCGCCCTCT
TTCGGCGGACTCGGGCCGCGGTTGGTCCCGCCGCTTCCTGGGGCTCCGGGCGGAGA

трансформируют полученной ДНК линии
клеток СНО, культивируют трансформиро-

ванные клетки с последующим выделением
и очисткой целевого продукта.

Разделение ВК-ДВО-плазмы на фракции А, В и С ВК-ДВО, ед/мл плазмы

Возраст/пол	Фракции		
	А	В	С
40/самец	5,9	6,2	7,0
34/самец	5,2	4,4	5,1
32/самец	2,3	5,2	6,4
33/самка	2,3	5,9	8,3
29/самка	3,3	6,1	7,3
Среднее значение ± ст. откл.	3,5 ± 1,5	5,6 ± 0,8	6,8 ± 1,2

Редактор З.Ходакова

Составитель Т.Забойкина
Техред М.Моргентал

Корректор С.Лисина

Заказ 4204

Тираж

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101