



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103771** (13) **C2**  
(51) МПК  
**C12N 9/68** (2006.01)  
**C12P 21/06** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2010 15856</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>03.06.2009</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.11.2013</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/058,677</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>04.06.2008</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>11.04.2011, Бюл.№ 7</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.11.2013, Бюл.№ 22</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2009/046152, 03.06.2009</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Кепф Едвард (US), Циммерман Томас П. (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ГРИФОЛЗ ТЕРАПЬЮТИКС ІНК., 4101 Research Commons, 79 TW Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709, United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Петошевіч Діна Анатоліївна, реєстр. №284</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US5876999 A, 02.03.1999. WO0136611 A1, 25.05.2001. WU X C ET AL: "Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in Bacillus subtilis: streptokinase with longer functional half-life", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 824-829. BANERJEE A ET AL: "Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 22, no. 4, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 287-307. MALKE H ET AL: "Nucleotide sequence of the streptokinase gene from Streptococcus equisimilis H46A", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 2-3, 1 January 1985 (1985-01-01), pages 357-362. US5854049 A, 29.12.1998. US2002192794 A1, 19.12.2002. US5288489 A, 22.02.1994. US5240845, 31.08.1993. ANIRBAN BANERJEE ET AL.: 'Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent.' BIOTECHNOLOGY ADVANCES vol. 22, 2004, pages 287 - 307.</p>
---	---

## (54) СТРЕПТОКИНАЗА, ЩО АКТИВУЄ ПЛАЗМІН, СПОСІБ І НАБІР ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПЛАЗМІНУ

### (57) Реферат:

Винахід належить до стрептокінази, іммобілізованої на матриці, яка активує плазміноген в плазмін, при цьому залишаючись стійкою до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу, яка містить амінокислотну послідовність, що має аспарагін в

UA 103771 C2

положеннях, які відповідають положенням 85 і 412 в SEQ ID NO:1 та до способу отримання плазміну, який включає контактування стрептокінази, іммобілізованої на матриці або матриці, яка має іммобілізовану на ній стрептокіназу, з плазміногеном, таким чином перетворюючи плазміноген в плазмін; і b) очищення плазміну, а також до набору для отримання плазміну.

(SEQ ID NO:3)

ggatcccATCGCTGGTCCCGAATGGCTCTTAGAOCGTCCATCTGTGAATAACTCCCAACTTGTAGTATC  
CGTTGCAGGCACCGTCGAAGGAACCAACCAAGACATCTCCTTAAATTTTTTGAAATCGATTTAAC  
CTCTCGTCTGCCCATGGCGGAAAAACCGAACAAGGCCTCTCACCAAACTCTAAACCTTTTGCCAC  
CGATTCAGGAGCTATGCCACACAACTCGAAAAAGCCGACCTCTTAAAGCTATCCAAGAACAAC  
TTATCGCTAATGTACATTCAAATGATGATTATTTTGAAGTAATTGATTTTGCGTCTGATGCCACAAT  
TACCGATCGCAATGGCAAAGTCTATTTTGCTGATAAAGACGGTAGCGTTACCTTGCCCACTCAGCC  
AGTACAGGAATTCTTATTATCCGGCCACGTGCGCGTACGTCCATATAAAGAAAAACCTATCCAAAA  
CCAAGCAAAATCAGTAGATGTTGAGTATACCGTGCAGTTTACACCGCTTAACCCCGACGATGATTT  
CCGCCCTGGATTAAAAGACACCAAATTACTGAAAACTTTAGCAATTGGCGACACCATTACCTCACA  
AGAACTGTTAGCACAAAGCACAACTCTATCCTTAACAAAACGCAOCCCGGCTATACCATTACGAACG  
CGACTCCTCTATTGTAACCCACGACAAOGATATTTCCGCACTATTCTGCCAATGGATCAAGAATT  
CACCTACCATGTAAAAAACCGCGAACAGGCTTACGAAATTAACAAAAAATCTGGTTTAAACGAAG  
AAATTAATAATACTGACCTGATCTCAGAAAAATATTACGTGCTGAAAAAAGGAGAAAAACCGTAT  
GATCCGTTTGATCGCAGCCATCTGAACTTTTACCATCAAATATGTCGATGTAAACACCAACGAA  
CTTTTAAATCTGAACAATTACTTACCGCCTCCGAACGCAACTTGGATTTCCGTGATCTGTACGAOC  
CTCGTGATAAAGCTAAACTCTTATACAACAACCTGGATGCCTTTGGAATTATGGACTATACGTAA  
CCGGCAAAGTTGAAGACAATCACGATGACACCAACCGCATTATTACTGTTTACATGGGGAAACGG  
CCTGAGGGAGAAAATGCCTCTTATCATCTTGCTTACGATAATGACCGCTATACCGAAGAAGAACGC  
GAAGTCTATTCTATCTGCGCTATACTGGAACACCTATCCCGACAACCCTAATGACAAAactcgag

Fig. 1

## ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

По даній заявці, згідно з 35 USC §119, вимагається пріоритет попередньої заявки США № 61/058677, поданої 4 червня 2008 року, зміст якої повністю включений за допомогою посилання в даний опис.

## 5 ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід належить до композицій і способів отримання плазміну, зокрема, до композицій і способів отримання плазміну з використанням іммобілізованої стрептокінази.

## РІВЕНЬ ВИНАХОДУ

10 Згустки крові (тромби) складаються з волокнистої мережі, розчиняти яку здатний протеолітичний фермент плазмін. Фермент утворюється з неактивного проферменту плазміногена, який є компонентом плазми крові, під дією активатора плазміногена. Існують два імунологічно відмінних активатори плазміногена ссавців. Ендогенний активатор плазміногена, який також називається урокіназою, являє собою фермент, що виробляється ниркою, і його можна виділяти з сечі. Також джерелом його отримання може бути ряд тканинних культур.

15 Екзогенний активатор плазміногена, який також називається судинним активатором плазміногена і тканинним активатором плазміногена (t-PA), можна виділяти з багатьох тканинних гомогенатів (зокрема, з людської матки), клітинної стінки судин і з деяких клітинних культур. У доповнення до вказаних двох видів активатора плазміногена також існує бактерійний продукт стрептокінази (стрептокіназа), що отримується зі стрептококів.

20 З розширенням застосування в клінічній практиці артеріальних і венозних катетерів локальна доставка активного плазміну надає привабливі терапевтичні можливості для тромболітичної терапії або відновлення прохідності затромбованих катетерів. Для цього існує ряд причин: 1) будучи активною протеазою серину, плазмін являє собою прямий розчинник тромбу на відміну від активаторів плазміногена, для яких необхідний субстрат (плазміноген) поблизу тромбу; 2) направлену локальним катетером тромболітичну терапію з активним плазміном можна інтенсифікувати до будь-якого рівня, необхідного для досягнення повного розчинення тромбу; 3) теоретично плазмін також може бути безпечнішим тромболітиком, оскільки нижче дозування, необхідне для локальної доставки, може зменшувати або навіть усувати ускладнення у вигляді кровотечі, пов'язані з високими дозами тромболітичної терапії, і

25 будь-яка потенційна залишкова дія плазміну в безпосередній близькості до тромбованої ділянки буде швидко нейтралізована за допомогою циркулюючого  $\alpha_2$ -антиплазміну.

Існує декілька технічних проблем, пов'язаних з очищенням плазміну, особливо при його терапевтичному застосуванні і доставці. Плазмін є активною протеазою серину, яка має тенденцію до аутолізу і інактивації при фізіологічному рівні pH. На жаль, розщеплення плазміну найбільш виражене в діапазоні рівня pH, який необхідний для вияву його функції, тобто, для розчинення тромбу.

30

У цей час в способах комерційного застосування активації отриманого з плазми плазміногена в плазмін задіяна розчинна стрептокіназа в реакції, яка здійснюється в рідкій фазі. Продукований в цій реакції активації плазмін не є повністю стабілізованим проти аутопротейолізу, поки продовжується етап активації до бажаного ступеня перетворення плазміногена в плазмін. Під час вказаної активації стрептокіназа розщеплюється плазміном, що вимагає видалення з кінцевого продукту множини молекулярних сполук стрептокінази. Додатково, знову утворені молекули плазміну можуть також почати розщеплювати інші молекули плазміну/плазміногена, що призводить до втрати цінного продукту, тобто, плазміну.

40

Таким чином, в цей час існує потреба в простих і ефективних способах або методиках отримання плазміну. Додатково бажано, щоб такий спосіб призводив до отримання розчинів плазміну, які по суті не містять стрептокіназу, таким чином, щоб при бажанні можна було застосовувати плазмін для введення (наприклад, парентерального) як фармацевтичний засіб.

45

## СУТЬ ВИНАХОДУ

50 У одному аспекті даний винахід належить до композиції, що містить стрептокіназу, іммобілізовану на матриці. Стрептокіназа являє собою мутантну стрептокіназу, яка відрізняється здатністю до активації плазміногена в плазмін, при цьому стійку до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу.

У іншому аспекті даний винахід належить до виробу, що містить матрицю з іммобілізованою на ній стрептокіназою, при цьому стрептокіназа являє собою мутантну стрептокіназу, яка відрізняється здатністю до активації плазміногена в плазмін, при цьому стійку до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу.

55

У деяких аспектах даний винахід належить до способу отримання плазміну. Спосіб включає:

60 а) контактування композиції, що містить плазміноген, зі стрептокіназою, іммобілізованою на матриці з перетворенням таким чином плазміногена в плазмін; і

b) очищення плазміну.

У інших аспектах даний винахід належить до набору для отримання плазміну. Набір містить:

a) стрептокіназу, іммобілізовану на матриці, при цьому стрептокіназа є мутантною стрептокіназою, яка відрізняється здатністю до активації плазміногена в плазмін, при цьому стійку до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу; і

b) зв'язуючу плазмін матрицю з розташованою на ній молекулою, яка має афінність до плазміну.

#### КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1 показує нуклеотидну послідовність (а саме, SEQ ID NO:3), яка містить відкриту рамку зчитування (позначену великими буквами), що кодує подвійний поліпептид мутантної стрептокінази. Показана відкрита рамка зчитування, фланкована ділянками рестрикційного ферменту (які позначені малими буквами), призначеними для клонування.

Фіг. 2 показує амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:4) поліпептидного продукту вектора експресії pET21 (pET System, Novagen, Madison, WI), що містить відкриту рамку зчитування (позначену великими буквами), показану в SEQ ID NO:3. Мутації від лізину (K) до аргініну (N) в поліпептиді стрептокінази підкреслені однією лінією. Амінокислотний залишок ізолейцину (I), який відповідає N-кінцю послідовності стрептокінази, виділений подвійним підкресленням.

Фіг. 3 показує амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:5) поліпептидного продукту вектора експресії pET32 (pET System, Novagen, Madison, WI), що містить відкриту рамку зчитування (позначену великими буквами), показану в SEQ ID NO:3. Мутації від лізину (K) до аргініну (N) в поліпептиді стрептокінази підкреслені однією лінією. Амінокислотний залишок ізолейцину (I), який відповідає N-кінцю послідовності стрептокінази, виділений подвійним підкресленням.

Фіг. 4 показує амінокислотну (послідовність SEQ ID NO: 6) поліпептидного продукту вектора експресії pET41 (pET System, Novagen, Madison, WI), що містить відкриту рамку зчитування (позначену великими буквами), показану в SEQ ID NO:3. Мутації від лізину (K) до аргініну (N) в поліпептиді стрептокінази підкреслені однією лінією. Амінокислотний залишок ізолейцину (I), який відповідає N-кінцю послідовності стрептокінази, виділений подвійним підкресленням.

Фіг. 5 показує електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію SDS-PAGE при фарбуванні Кумасі синім очищеної рекомбінантної стрептокінази (смуга 1); маркера молекулярної маси (MM) SeeBlue® Plus 2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (смуга 2); і рекомбінантного плазміногена (смуга 3).

Фіг. 6 представляє SDS-PAGE і показує залежність від часу для перетворення рекомбінантного плазміногена в рекомбінантний плазмін, що каталізується рекомбінантною стрептокіназою. Показники часу = 0 годин (смуга 1); 2 години (смуга 2); 4 години (смуга 3); 6 годин (смуга 4); і 18 годин (смуга 5). Смуги 6, 7, і 8 відповідають контрольній рекомбінантній стрептокіназі, контрольному рекомбінантному плазміногену і маркеру MM (SeeBlue® Плюс 2), відповідно.

Фіг. 7 представляє вестерн-блотинг експерименту визначення залежності від часу, показаного в фігурі 6, з використанням поліклональних анти-стрептокіназних антитіл. Показники часу = 0 годин (смуга 1); 2 години (смуга 2); 4 години (смуга 3); 6 годин (смуга 4); і 18 годин (смуга 5). Смуги 6, 7 і 8 належать до контрольної рекомбінантної стрептокінази, контрольного рекомбінантного плазміногена і маркера MM (SeeBlue® Плюс 2), відповідно.

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Спосіб очищення плазміну, розкритий в даному винаході, є простим, ефективним, відтворюваним і надійним. Вказаним способом можна отримувати достатню кількість високо очищеного плазміну, що має активність, порівнянну з потенційною активністю очищених препаратів плазміногена. Очищення може щонайменше зберігати активність плазміну або навіть збільшувати її. У кінцевому плазміні міститься мінімальна кількість стрептокінази або вона відсутня, оскільки її наявність небажана для терапевтичного застосування. У одному варіанті здійснення спосіб очищення плазміну включає наступні основні етапи: етап а: активація плазміногена в плазмін з використанням іммобілізованої стрептокінази, де вказана стрептокіназа являє собою мутантну стрептокіназу, яка відрізняється здатністю до активації плазміногена в плазмін, при цьому стійку до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу; і етап b: захоплення активного плазміну на плазмін-захоплюючій матриці, такий як, наприклад, бензамідин-сефароза. Необов'язково, спосіб додатково включає елювання пов'язаного плазміну з буфером з низьким рівнем pH; і, додатково необов'язково, приготування кінцевого плазміну в підкисленій до рівня pH 3,7 воді.

#### 1. Стрептокіназа

У даному винаході розглянута стрептокіназа природного походження, а також рекомбінантна стрептокіназа. Без зв'язку з конкретною теорією передбачається, що під механізмом активації стрептокінази мають на увазі утворення стехіометричного комплексу з плазміненом.

Поняття "природного походження", яке використовується в даному винаході застосовно до стрептокінази, належить до того факту, що таку стрептокіназу можна виділяти з природного джерела, і людина не піддавала її навмисній модифікації в лабораторії. Мається на увазі, що стрептокінази природного походження включають стрептокіназу "мутантних" форм природного походження, які є стійкими до плазміну в порівнянні зі стрептокіназою "дикого типу" природного походження.

"Рекомбінантна" стрептокіназа належить до стрептокіназ, які отримуються технологією рекомбінантної ДНК, тобто продукуються з клітин, трансформованих екзогенною конструкцією ДНК, що кодує бажану стрептокіназу, яка може бути стрептокіназою дикого типу або плазмін-резистентним мутантом.

"Синтетичні" стрептокінази являють собою стрептокінази, отримані шляхом хімічного синтезу.

Стрептокіназа природного походження продукується певними *Streptococci* і певними бактеріями, які несуть відповідний генетичний матеріал, отриманий з *Streptococci* груп Lancefield A, C або G. Наприклад, стрептокіназу можна отримувати з культур штаму H46A *S. equisimilis*.

Описані численні способи очищення стрептокінази, що включають, наприклад, патенти США №№ 2701227, 2702781, 2677642, 2677643, 2691620, 2784145, 3226304, 3255094, 3419472, 3444045, 3980772, 4381346, RE32271 і 5334384, які включені за допомогою посилання в даний опис.

У стрептокіназі не містяться амінокислоти цистеїн або цистин, на відміну від стрептолізину або стрептодорнази, які є звичайними домішковими білками, що являють собою домішки в препаратах стрептокінази природного походження (Einarsson et al., *Biochim. Biophys. Acta* 568:19-29 (1979); De Renzo et al., *J. Biol. Chem.* 242, 533-542 (1967)). Було запропоновано використати вказану структурну відмінність для отримання способу очищення стрептокінази з ферментаційного бульйону. Наприклад, патент США № 5334384 описує спосіб відділення стрептокінази від домішкових білків в суміші, що містить стрептокіназу, і вказаний спосіб включає обробку суміші відновником для відновлення дисульфідних містків в домішкових білках, щоб звільнити тіолові групи, контактування суміші з реактивом, здатним до реакції з вільною тіоловою групою і з тіолвмісною матрицею, і після цього сепарацію хімічно модифікованих домішкових білків, що отримуються з суміші, щоб отримати форму стрептокінази, яка по суті не містить домішкових білків.

Ген, що кодує стрептокіназу, був виділений з його природного джерела (види *Streptococcus*), і клонувани в декілька гетерологічних мікроорганізмів, таких як дріжджі (Hagenson et al., *Enzyme. Microb. Technol.* 11:650 (1989)), бактерії, а саме, *E. coli* (Malke et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 81:3557 (1984)), інші види *Streptococcus* (Malke et al., *Mol. Gen. Genet.* 196:360 (1984)), і *Bacillus* (Wong et al., *Applied and Env. Microbiol.* 1:517 (1994)), всі з яких включені в даний винахід з посиланням на їх теорії, що належать до виділення і клонування стрептокінази. Додатково, в даний винахід включені посилання на Caballero et al., *Infection and Immunity*, 67:6478-6486 (1999) в частині їх теорії, яка належить до клонування і характеристик стрептокіназ, які продукують виділені свинячі і кінські *Streptococcus equisimilis*, і до використання матриці для іммобілізації рекомбінантного білка. Таблиця 1 показує амінокислотну послідовність стрептокінази, що кодується геном стрептокінази зі штаму H46A *Streptococcus equisimilis*, що опубліковано Malke et al., *Gene* 34:357-362 (1985) (див. також GenBank, номер доступу 1106184A), і включено в даний винахід за допомогою посилання.

Таблиця 1

Амінокислотна послідовність стрептокінази згідно з номером доступу 1106184A GENBANK

Амінокислотна послідовність <sup>†</sup> (SEQ ID NO: 1)	
1	MKNYLSFGMF ALLFALTFGT VNSVQAIAGP EWLLDRPSVN NSQLWSVAG TVEGTNQDIS
61	LKFFEIDLTS RPAHGGKTEQ GLSPKSKPFA TDSGAMSHKL EKADLLKAIQ EQLIANVHSN
121	DDYFEVIDFA SDATITDRNG KVFYADKDGs VTLPTQPVQE FLLSGHVRVR PYKEKPIQNN
181	AKSVDVEYTV QFTPLNPDDD FRPGLKDTKL LKTLAIGDTI TSQELLAQAQ SILNKNHPGY
241	TTYERDSSIV THDNDIFRTI LPMDQEFTYR VKNREQAYRI NKKSGLNEEI NNTDLISEKY
301	YVLKKGEKPY DPFDRSHLKL FTIKYVDVDT NELLKSEQLL TASERNLDFR DLYDPRDKAK
361	LLYNNLDAFG IMDYTLTGKV EDNHDDTNRI ITVYMGRPE GENASYHLAY DKDRYTEEER
421	EVYSYLRVTG TPIPDNPNDK

<sup>†</sup>Вказані 26 амінокислот, які відповідають сигнальній послідовності, підкреслені (зрілий білок починається з ізолейцину (I) в положенні 27). Залишки лізину (K) в положенні 85 і 412 підкреслені подвійною лінією (K: лізин).

Додатково, стрептокіназа є комерційно доступною, як наприклад, стрептокіназа з  $\beta$ -гемолітичного стрептокока (група C Lancefield) (Sigma-Aldrich Corp., St-Louis, MO) і рекомбінантна стрептокіназа, яка продукується E.Coli шляхом хроматографічних технологій (ABR-Affinity BioReagents Inc, Golden, CO). Додатково, були описані (EC 0397366 A1) генетично модифіковані похідні стрептокінази, що містять крингл-домени зв'язування фібрину, які походять з плазмінотена, і способи їх отримання способами рекомбінантної ДНК.

У деяких варіантах здійснення стрептокінази, яка повинна бути іммобілізована, є рекомбінантною стрептокіназою (наприклад, рекомбінантом дикого типу або мутантом, стійким до плазміну), що отримується шляхом експресії з рекомбінантної ДНК або в умовах *in vivo* або *in vitro*. Рекомбінантна технологія є загальноприйнятою і відомою в даній галузі техніки. Афінні мітки амінокислоти можна вставляти за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Експресії можна здійснювати *in vivo*, використовуючи як бактерії (наприклад, E. coli), нижчі еукаріоти (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*) або вищі еукаріоти (наприклад, бакуло-інфіковані клітини комах, клітини комах, клітини ссавців), так і *in vitro* (лізати E. coli, екстракти зародків пшениці, лізати ретикулоцитів). Стрептокіназу можна очищати афінною хроматографією з використанням комерційно доступних смол.

Послідовності ДНК, що кодують амінокислотні афінні мітки і адапторні білки, можна конструювати у вектори експресії таким чином, що гени, які розглядаються, можна клонувати в рамці або 5' або 3' послідовності ДНК, що кодує афінну мітку і адапторний білок. Вектор може нести початок реплікації і ген, здатний додавати клітині-хазяю стійкості до антибіотиків. Вставка цього вектора може містити промоторну послідовність, ген, що кодує стрептокіназу, яка розглядається, необов'язково, послідовність, що кодує поліпептидну афінну мітку, і сигнальну послідовність термінації. Необов'язково, вектор може також містити послідовність, яка кодує молекулу поліпептидного адаптора, переважно розташовану між ділянками, що кодують білок і афінну мітку.

Для експресії *in vivo* білків можна клонувати кДНК в комерційно доступні вектори експресії (наприклад, що поставляються компаніями Qiagen, Novagen, Clontech) і вводити у відповідний організм для експресії. Для експресії *in vitro* ПЛР-ампліфіковані послідовності ДНК можна використовувати безпосередньо спареними *in vitro* в системах транскрипції/трансляції (наприклад, лізати E. coli S30, отримані експресією РНК полімерази T7, переважно протеазо-дефіцитні штами, лізати пшеничних зародків, лізати ретикулоцитів з мікросомами і без мікросом (наприклад, що поставляються компаніями Promega, Pharmacia, Panvera)).

Полімеразні ланцюгові реакції (ПЛР) можна проводити в стандартних умовах або оптимізувати без невиправданого експериментування. Олігонуклеотидні праймери можуть нести унікальні сайти рестрикції для полегшення клонування у вектори експресії. Альтернативно, можна використовувати клонуючу систему TA (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA). Вектори експресії містять послідовності для афінних міток і білкових адапторів. Продукти ПЛР лігують у вектори експресії (за допомогою індукційних промоторів), і вводять у прийнятний компетентний штам E. coli шляхом кальційзалежної трансформації (штами включають в себе: XL-1 Blue, BL21, SG13009 (lon-)). Культури можна вирощувати до

середини логарифмічного зростання, індукованого для експресії, і збирати клітини шляхом центрифугування. Клітини, що містять лізозим, можна ресуспендувати і руйнувати мембрани швидкими циклами заморожування/відтавання або за допомогою ультразвуку. Клітинний дебрис можна видаляти шляхом центрифугування, і можна додавати до супернатантів прийнятну матрицю афінності. Стрептокіназа, яка розглядається, є зв'язаною, неспецифічно зв'язані білки видаляють повторними етапами промивання. Альтернативно, можна використовувати магнітні кульки для афінності і пристрої для фільтрації (QIAGEN, Inc, Valencia, CA).

Для *Saccharomyces cerevisiae* можливо глікозилювання серцевини і ліпідна модифікація білків. Підхід, описаний вище для *E. coli*, можна застосовувати з невеликими модифікаціями для трансформації і лізису клітин. Трансформацію *Saccharomyces cerevisiae* можна здійснювати ацетатом літію, і лізувати клітини можна або шляхом літиказного розщеплення клітинної стінки з подальшим заморожуванням/відтаванням, обробкою ультразвуком або екстракцією скляними намістинами. Якщо бажано, варіанти посттрансляційних модифікацій можна отримувати з різними штамми дріжджів (а саме, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*).

Перевага бакуловірсної системи або клітин ссавців полягає у великій кількості можливих посттрансляційних модифікацій. Для бакуло-системи необхідне клонування вірусів, отримання початкових високих титрів і інфікування рідких суспензій клітин комах (клітини - SF9, SF21). Для експресії на основі клітин ссавців необхідні трансфекції і клонування клітинних ліній. Відбір розчинних білків здійснюють з середовища, тоді як внутрішньоклітинні або зв'язані з мембраною білки вимагають лізису клітини (або солюбілізацію детергентом, відтавання/заморожування). Потім білки можна очищати аналогічно процедурі, описаній для *E. coli*.

Для трансляції *in vitro* системою вибору є лізати *E. coli*, отримані з протеазо-дефіцитних штамів і штамів з надекспресією РНК-полімерази Т7. Лізати *E. coli* забезпечують ефективну експресію білка (30-50 мкг/мл лізатів). Весь процес здійснюють в 96-ямкових матрицях. Гени, які розглядаються, ампліфікують за допомогою ПЛР з використанням олігонуклеотидів, які містять ген-специфічні послідовності, що містять промотор РНК-полімерази Т7 і зв'язувальну ділянку, і послідовність, що кодує афінну мітку. Альтернативно, адапторний білок можна зливати з геном, який розглядається, з допомогою ПЛР. Для швидкого аналізу ампліфіковані ДНК можна напряму піддавати транскрипції і трансляції в лізати *E. coli* без попереднього клонування. Потім білки виділяють шляхом зв'язування з матрицею афінності і процесують, як описано вище.

Можливі для використання альтернативні системи включають екстракти пшеничних зародків і екстракти ретикулоцитів. Для синтезу мембранних білків *in vitro* і/або посттрансляційно модифікованих білків будуть потрібні лізати ретикулоцитів в комбінації з мікросомами.

#### а) Плазмін-резистентна стрептокіназа

Стрептокіназа є лабільним білком, сприйнятливим до розщеплення в реакції з плазмінном. Виявлено, що фрагменти розщепленої плазмінном стрептокінази виявляють слабку дію як активатора плазмінногена в порівнянні з нативною стрептокіназою (Shi et al., Biochem. J. 304: 235-241 (1994)). Були заздалегідь визначені пептидні зв'язки молекули стрептокінази, які гідролізуються плазмінном (Shi et al, див. вище). Плазмін специфічно каталізує гідроліз пептидних зв'язків, що мають на аміно-кінці Lys і Arg. Більш конкретно, пептидний зв'язок стрептокінази Lys59-Ser60 належить до нечисленних пептидних зв'язків, які розщеплюються на початку реакції з плазмінном, тоді як NH<sub>2</sub>-кінцевий пептид Ile1-Lys59 необхідний для стабілізації структури стрептокінази (Shi et al., вище). Таким чином, можна сконструювати більш стійку мутантну стрептокіназу шляхом сайт-направленого мутагенезу або іншими прийнятними способами генетичного клонування, в яких можна запобігти ранньому гідролізу плазмінном пептидного зв'язку Lys59-Ser60.

Мутантні форми стрептокінази описані, наприклад, в патентах США № 587699, 5854049, 6413759, 6309873 і авторами Wu et al., Applied and Environmental Microbiology, 64:824-829 (1998), всі з яких повністю включені в даний опис.

У одному варіанті здійснення стрептокіназа являє собою мутантну стрептокіназу, яка відрізняється здатністю до активації плазмінногена в плазмін і зберігає стійкість до розщеплення плазміну відносно відповідної їй стрептокінази дикого типу. У іншому варіанті здійснення стрептокіназа містить амінокислотну послідовність, що має амінокислоту, яка відрізняється від лізину в положенні, відповідному положенню 85, 412, або в обох положеннях в SEQ ID NO:1. У деяких варіантах здійснення амінокислотою, відмінною від лізину в положенні, відповідному положенню 85, 412, або обом положенням в SEQ ID NO:1, є аспарагін або глутамін. У одному варіанті здійснення поліпептид стрептокінази містить амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO:2 (таблиця 2). У іншому варіанті здійснення поліпептид стрептокінази містить амінокислотні залишки 27-440, показані в SEQ ID NO:2 (таблиця 2).

Таблиця 2

Амінокислотна послідовність, яка відповідає  
плазміно-резистентній стрептокіназі відповідно до одного варіанту здійснення

Амінокислотна послідовність <sup>†</sup> (SEQ ID NO: 2)	
1	MKNYLSFGMF ALLFALTFGT VNSVQAIAGP EWLLDRPSVN NSQLWSVAG TVEGTNQDIS
61	LKFFEIDLTS RPAHGGKTEQ GLSPNSKPFA TDSGAMSHKL EKADLLKAIQ EQLIANVHSN
121	DDYFEVIDFA SDATITDRNG KVFYADKDGs VTLPTQPVQE FLLSGHVRVR PYKEKPIQNQ
181	AKSVDVEYTV QFTPLNPDDD FRPGLKDTKL LKTLAGDTI TSQELLAQAQ SILNKNHPGY
241	TIYERDSSIV THDNDIFRTI LPMDQEFTYR VKNREQAYRI NKKSGLNEEI NNTDLISEKY
301	YVLKKGEKPY DPFDRSHLKL FTIKYVDVDT NELLKSEQLL TASERNLDFR DLYDPRDKAK
361	LLYNNLDAFG IMDYTLTGKV EDNHDDTNRI ITVYMGKRPE GENASYHLAY DNDRYTEEER
421	EVYSYLRVTG TPIPDNPNDK

<sup>†</sup>Вказані 26 амінокислот, які відповідають сигнальній послідовності, підкреслені (зрілий білок починається з ізолейцину (I) в положенні 27). Мутації K85N і K412N підкреслені подвійною лінією (K: лізин; N: аспарагін).

У інших варіантах здійснення послідовність стрептокінази, необов'язково, додатково містить полярні або заряджені залишки в одному або декількох положеннях, які відповідають положенням 406-410 в SEQ ID NO:1.

#### 2. Імобілізована стрептокіназа

Імобілізовану стрептокіназу можна використовувати для активації плазміногена в плазміно. Такий підхід забезпечує невелику кількість домішок в кінцевому препараті безпосередньо зі стрептокіназою, або їх відсутність. Існує велика кількість методик імобілізації стрептокінази.

Стрептокіназу можна адсорбувати на прийнятну матрицю. Наприклад, з публікацій відомо, що стрептокіназа зберігає здатність до активації плазміногена в плазміно, якщо стрептокіназа щільно зв'язана з нітроцелюлозою (Kulisek et al., Analytical Biochemistry 177:78-84 (1989)). Також адсорбція стрептокінази на прийнятній іоннообмінній смолі може призводити до її імобілізації із збереженням здатності до активації плазміногена.

Імобілізована стрептокіназа була описана авторами Rimon et al., Biochem. Biophys. Acta 73:301 (1963), які використовували діазотизований співполімер р-амінофенілаланіну і лейцину. Ці автори використовували імобілізовану стрептокіназу для вивчення механізму активації плазміногена. Дослідники Sugitachi et al., Thrombos. Haemostas (Stuttg). 39:426 (1978) описали імобілізацію активатора плазміногена урокінази на нейлоні. У патенті США № 4305926, включеному у винахід за допомогою посилання, пропонується імобілізація стрептокінази на біосумісний полімер, такий як нейлон, дакрон, колаген, полівінілпіролідін або співполімер р-амінофенілаланіну і лейцину.

У одному варіанті здійснення стрептокіназу імобілізують на поверхні, використовуючи афінну мітку, як описано в патенті США № 6406921, який повністю включений в даний опис за допомогою посилання. Поверхня може бути або органічною або неорганічною, біологічною або небіологічною, або являти собою будь-яку комбінацію вказаних матеріалів. У одному варіанті здійснення поверхня є прозорою або просвічувальною. Для використання як поверхні підходить множина матеріалів. Наприклад, поверхня може містити матеріал, вибраний з групи, яка складається з силікону, кремнію, кварцу, скла, скла з регульованими порами, вуглецю, оксиду алюмінію, діоксиду титану, германію, нітриду кремнію, цеолітів і арсеніду галію. Ряд металів, таких як золото, платина, алюміній, мідь, титан і їх сплави також є варіантами для поверхонь. Додатково, також можна використовувати багато які керамічні і полімерні матеріали. Полімери, які можна використовувати як поверхню, включають без обмеження наступне: полістирол; полі(тетра)фторетилен; (полі)вінілідендифторид; полікарбонат; поліметилметакрилат; полівінілетилен; поліетиленимін; полі(ефірефір)кетон; поліоксиметилен (ПОМ); полівінілфенол; полілактиди; поліметакрилімід (ПМІ); поліалкенсульфон (ПАС); полігідроксietилметакрилат; полідиметилсилоксан; поліакриламід; поліімід; блок-співполімери; і Eupergit™ Photoresists, полімеризовані плівки Ленгмюра-Блоджетта (Langmuir-Blodgett), і структури LIGA, які можуть також служити як поверхні в даному винаході.

Термін "афінна мітка", який використовується в даному винаході, належить до функціональної групи, здатної до імобілізації білка на функціональні групи, які виступають на



поверхні. У деяких випадках афінною міткою може бути проста хімічна функціональна група. Інші варіанти включають амінокислоти, поліпептиди, білки, двошарові ліпіди або гідрогель. Афінна мітка може бути сполучена з білком або ковалентно, або нековалентно (наприклад, за допомогою хімічної сполуки або як злитий білок). Аналогічно, афінна мітка може як ковалентно, так і нековалентно зв'язуватися з поверхневим шаром.

Термін "адапторна молекула" в даному винаході означає будь-яку структуру, яка зв'язує афінну мітку з білком. Адапторна молекула не повинна бути обов'язково дискретною молекулою, яка нековалентно приєднана як до афінної мітки, так і до білка. Адапторна молекула може ковалентно приєднуватися до афінної мітки або до білка або до них обох (наприклад, за допомогою хімічної сполуки або як злитий білок). У деяких випадках афінна мітка може також бути внутрішньою частиною білка, наприклад, амінокислотою. Приклади адапторних молекул включають поліпептиди, білки, мембранні якорі і біотин.

Термін "злитий білок" належить до білка, що складається з двох або більше поліпептидів, які в нативному стані звичайно не є сполученими, і які сполучаються пептидним зв'язком за допомогою своїх відповідних аміно- і карбоксикінців з утворенням монолітного безперервного поліпептиду. Мається на увазі, що два або більше поліпептидних компонентів можуть сполучатися або прямим або опосередкованим чином за допомогою пептидного лінкера/спейсера.

Поверхня може бути покрита шаром органічних молекул. Одна сторона шару може складатися з хімічних функціональних груп на кінцях органічних молекул, які хімічно або фізично сорбовані на матеріалі поверхні (головні групи). Інша сторона шару може виступати на поверхні і може мати будь-яке число хімічних функціональних груп (кінцеві групи). У деяких варіантах здійснення молекули шару високо впорядковані і щільно упаковані, значною мірою завдяки ван-дер-ваальсовим і гідрофобним взаємодіям між молекулами.

Афінна мітка може збільшувати іммобілізацію стрептокінази на поверхні. Афінна мітка може збільшувати зв'язування або посилювати реакції стрептокінази з функціональною групою. Пара афінна мітка/функціональна група можуть допускати іммобілізацію стрептокінази на поверхні так, що не потрібно жорстких умов реакції, які несприятливі для стабільності або функції стрептокінази. Афінна мітка також може передбачати іммобілізацію, яка є специфічною для позначеного сайту або ділянки на стрептокіназі. Для її здійснення приєднання афінної мітки до білка стрептокінази повинно бути сайт-специфічним. Така сайт-специфічна іммобілізація може сприяти гарантії, що активна ділянка білка залишиться доступною для лігандів в розчині. Інша перевага іммобілізації за допомогою афінних міток полягає в тому, що вона дозволяє застосовувати загальну стратегію іммобілізації з множиною різних білків.

У деяких варіантах здійснення афінна мітка містить щонайменше одну амінокислоту. Афінна мітка може бути поліпептидом, що містить щонайменше одну активну амінокислоту. Альтернативно, афінна мітка може бути одиночною амінокислотою активного шару органічної молекули, такою як, наприклад, цистеїн, лізин, гістидин, аргінін, тирозин і глутамін. Поліпептидна або амінокислотна афінна мітка переважно експресується як білок, злитий з білком. Амінокислотні мітки несуть або моноамінокислоту або ряд амінокислот, які можуть взаємодіяти з функціональною групою молекулярного шару. Амінокислоти афінної мітки можна легко вставляти в рекомбінантні білки для полегшення іммобілізації, що орієнтується з допомогою ковалентного з'єднання з біореактивною Y-функціональною групою моношару.

Афінна мітка може містити полі(амінокислотну) мітку. Полі(амінокислотна) мітка являє собою поліпептид, який містить від близько 2 до близько 100 залишків моноамінокислоти, що необов'язково перериваються залишками інших амінокислот. Наприклад, афінна мітка може містити поліцистеїн, полілізин, поліаргінін або полігістидин. Амінокислотні мітки переважно складаються із залишків моноамінокислоти в кількості від двох до двадцяти, наприклад, таких як гістидини, лізини, аргініни, цистеїни, глутаміни, тирозини або їх будь-які комбінації.

У одному варіанті здійснення амінокислотні мітки з однієї - двадцяти амінокислот містять щонайменше від одного до десяти цистеїнів для тіоефірного зв'язку; або від одного до десяти лізинів для амідного зв'язку; або від одного до десяти аргінінів для приєднання до оточуючих дикарбонільних груп. Рядовий фахівець в даній галузі техніки може легко з'єднувати прийнятні афінні мітки із заданими Y-функціональними групами.

Амінокислотна мітка може розташовуватися на аміно- або карбоксикінці білка стрептокінази або де-небудь між ними. При відповідності з функцією білка введені для очищення білка афінні мітки переважно розташовані на С-кінці рекомбінантного білка, для гарантії того, що в ході очищення білка виділяють тільки повнорозмірні білки.

Афінні мітки можуть також містити одну або декілька неприродних амінокислот. Неприродні амінокислоти можна вводити з допомогою супресорних tRNA, які розпізнають термінуючі кодони

(тобто, амбер-кодони) (Noren et al, Science, 1989, 244:182-188; Ellman et al., Methods Enzym., 1991, 202:301-336; Cload et al., Chem. Biol., 1996, 3:1033-1038). Здійснюють хімічне аміноацилювання тРНК, щоб вони містили хімічно змінені ("неприродні") амінокислоти для використання зі специфічними хімічними агентами приєднання (а саме, з кетонними модифікаціями, фотореактивними групами).

У деяких варіантах здійснення афінна мітка містить без обмеження цілий білок, такий як глутатіон-S-трансфераза, антитіло, авідин або стрептавідин.

Інші способи кон'югації і іммобілізації білка, відомі в даній галузі техніки, можна адаптувати з метою іммобілізації стрептокінази на поверхні. Наприклад, афінна мітка може являти собою органічний біокон'югат, який хімічно приєднаний до стрептокінази. Біотин або антигени можуть бути хімічно зшиті зі стрептокіназою. Альтернативно, можна застосовувати хімічний крос-лінкер, який приєднує на поверхню стрептокінази просту функціональну групу, таку як тіол або амін.

У інших варіантах здійснення афінна мітка являє собою компонент шару афінної мітки, іммобілізованої на шарі органічних молекул на поверхні. Наприклад, гідрогель, що складається з такого матеріалу, як декстран, може служити прийнятним шаром афінної мітки. Використання таких гідрогелів для іммобілізації білка описані в патенті США № 5242828. Іншим варіантом матеріалу, придатного для утворення шару афінної мітки, є полілізин (як приклад, див. патент США № 5629213). Шар афінної мітки також може складатися з фосфоліпідного бішару або фосфоліпідного моношару, як описано в публікації PCT WO 96/38726.

Також в додаткових варіантах здійснення адапторна молекула може зв'язувати афінну мітку з іммобілізованою стрептокіназою. Може давати перевагу додатковий простір між білком і поверхнею, який створюється за допомогою адапторної молекули, оскільки білки можуть мати тенденцію до поверхневої інактивації. Рядовий фахівець в даній галузі техніки зможе вибрати адапторну молекулу, яка підходить для заданої афінної мітки. Наприклад, якщо афінною міткою є стрептавідин, то адаптор може являти собою молекулу біотину, хімічно кон'юговану зі стрептокіназою, яку треба іммобілізувати. Альтернативно, якщо афінною міткою є фосфоліпідний бішар або моношар, тоді як прийнятну адапторну молекулу можна вибирати мембранний якір.

У одному варіанті здійснення адапторна молекула є поліпептидом, наприклад, білком G або білком A. В іншому варіанті здійснення афінна мітка, адапторна молекула і білок разом складають злитий білок. Такий злитий білок можна легко експресувати за допомогою стандартної технології рекомбінантної ДНК. Адапторні білки є особливо корисними для підвищення розчинності білка, який розглядається, і збільшення відстані між поверхнею і білком, який розглядається. Приклади можливих адапторних білків включають глутатіон-S-трансферазу (GST), мальтозозв'язувальний білок, хітинзв'язувальний білок, тіоредоксин, зелений флуоресцентний білок (GFP). GFP також можна застосовувати для кількісного аналізу поверхневого зв'язування.

У іншому варіанті здійснення рекомбінантну стрептокіназу можна іммобілізувати за допомогою афінної хроматографії з використанням іммобілізованих металів (IMAC). Цей хроматографічний спосіб, який являє собою особливо чутливу технологію розділення, також застосовний до більшості типів білків, є технологією, що звичайно застосовується в схемах очищення разом з іншим етапом хроматографії, наприклад, з іонообмінною хроматографією (IOX) і/або хроматографією гідрофобного взаємодії (ХГВ).

Для IMAC застосовують матриці, які містять групу, здатну до утворення хелату з іоном перехідного металу, і вказаний хелат в свою чергу використовується в хроматографії як ліганд для адсорбції сполуки з рідини. На силу зв'язування в IMAC переважно впливає вид іона металів, рівень рН буферів і природа застосовуваного ліганду. Оскільки іони металів тісно пов'язані з матрицею, адсорбований білок необов'язково можна елювати або шляхом зниження рівня рН або конкурентного елюванням.

Загалом, IMAC придатна для розділення білків або інших молекул, які представляють афінність до іона перехідного металу в матриці. Наприклад, білки будуть зв'язуватися з матрицею в присутності доступних залишків гістидину, цистеїну і триптофану, всі з яких виявляють афінність до хелатуючого металу.

У одному варіанті здійснення стрептокіназу можна мітити одним або більше залишками гістидину для підвищення їх афінності до метало-хелатуючих лігандів.

Як ліганди для IMAC були запропоновані прості хелатори, такі як імінодіоцтова кислота (IDA). IDA, сполучену з агарозними основами і заряджену потім іонами різних металів, таких як  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  і  $\text{Ni}^{2+}$ , використовували для захоплення білків і пептидів, також вона комерційно доступна у вигляді смол. Більш конкретно, патент США № 4551271 (Hochuli, переуступлений Hoffmann-La Roche Inc), який включений в даний винахід за допомогою посилання, розкриває

смолю метало-хелатів, яка містить IDA-ліганди. Смолю згідно з описом можна виготовляти відомим способом шляхом обробки агарози епіхлоргідрином або епібромгідрином, проведенням реакції епоксиду, що отримується з динатрієвою сіллю імінооцтової кислоти і перетворення продукту в сіль міді або цинку за допомогою промивання розчином міді (II) або цинку.

Обидва патенти - EP 87109892.7 (F. Hoffmann-La Roche AG) і еквівалентний патент США №4877830 (Dobeli et al., переуступлений Hoffmann-La Roche Inc), включені в даний винахід за допомогою посилання на викладену в них теорію іммобілізації білка з використанням смол метало-хелатів.

Патент WO 01/81365 (Sigma-Aldrich Co.), який включений у винахід за допомогою посилання на викладену в ньому теорію композицій метало-хелатів, які згідно з описом здатні до утворення відносно стійких хелатів з іонами металів і показують поліпшену селективність для мічених полігістидином білків. Згідно з приведеними прикладами, розкриті композиції з'єднують з нерозчинним носієм, таким як СЕФАРОЗА™.

Посилання на дані Lizano et al., J. Microbiol. Methods, 23:261-280 по використанню матриці для іммобілізації рекомбінантного білка включене в даний винахід.

Композиції за даним винаходом також можуть доставлятися у вигляді набору. Відповідно, в інших аспектах даний винахід належить до набору для отримання плазміну. Набір містить стрептокіназу, іммобілізовану на матриці, і ця стрептокіназа є мутантною стрептокіназою, яка відрізняється здатністю до активації плазміногена в плазмін, при цьому зберігає стійкість до розщеплення плазміном відносно відповідної їй стрептокіназі дикого типу. Опис стрептокінази приведений вище.

У одному варіанті здійснення набір додатково містить плазмінів'язувальну матрицю з розташованою на ній молекулою, що має афінність до плазміну.

Набори можуть містити різні компоненти в окремих контейнерах. Наприклад, контейнери можуть окремо містити стрептокіназу, матрицю і т. д. таким чином, що при об'єднанні з іншими компонентами набору створюються композиції і способи отримання плазміну. Упаковані композиції і набори даного винаходу також можуть включати в себе інструкції для зберігання, виготовлення і тому подібне.

Даний винахід буде більш детально описаний за допомогою прикладів, при цьому необхідно зазначити, що приклади не обмежують об'єм винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1

Отримання міченої рекомбінантної стрептокінази

Синтезували молекулу ДНК, показану в фігурі 1 (а саме, SEQ ID NO:3), яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує білок стрептокінази з подвійною мутацією (Blue Heron Biotech, Bothell, WA) і клонували (для полегшення клонування вставляли ділянки 5' BamHI і 3' XhoI) в комерційно доступні вектори pET21b, pET32b і pET41b (EMD Chemicals, Inc (Novagen®), Gibbstown, NJ) для отримання декількох рекомбінантних поліпептидів (фіг. 2-4, відповідно), що містять амінокислотні послідовності, які відповідають плазмін-резистентній стрептокіназі, які приєднуються на С- і/або N-кінці з різними мітками, що включають в себе полігістидин, тіоредоксин і GST. Вказані мітки сприяють афінному очищенню трьох молекул рекомбінантної стрептокінази з використанням відповідних наборів смол і буферів згідно з протоколами виготовника і згідно з описом в керівництві Novagen® pET System Manual, 11-ий випуск, який включений у винахід з його вказівками по наведеному генному клонуванню, експресії і афінному очищенню білків-мішеней.

Всі три конструкції ДНК рекомбінантних стрептокіназ були трансформовані в E. coli - компетентні клітини BL21 (DE3) Gold (Stratagene, La Jolla, CA) і вирощені з використанням середовища Лурія-Бертані (LB). Звичайно протягом ночі при 37°C вирощували близько 0,5 мл культури і використали для інокуляції приблизно 200 мл свіжого середовища LB. Для конструкцій pET21b і pET32b до середовища LB додавали 50 мкг/мл ампіциліну, тоді як конструкцію pET41b вирощували в присутності 30 мкг/мл канаміцину. Кожну культуру вирощували до значення OD<sub>595nm</sub> приблизно 0,7 і потім індукували додаванням 1,0 мМ ізопропіл β-D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG). Через чотири години вирощування при 37°C з культур шляхом центрифугування збирали клітини і заморожували їх до -20°C до використання.

Початкові етапи очищення рекомбінантної стрептокінази для всіх трьох конструкцій були схожими і включали в себе лізис клітини і освітлення. Відталу клітинну масу ресуспендували в 20 мл реагенту для екстракції бактерійного білка (BPER) (Pierce, Rockford, IL), і потім культивували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Лізовані культури освітлювались центрифугуванням протягом 20 хвилин при 15 K (ротатор Sorvall SS34 в центрифугу RC5C) і фільтрувалися через фільтр 0,22 мкм.

Використовували кобальтову заряджену хелатуючу колонку 5 мл HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ) для очищення рекомбінантної стрептокінази від культур, отриманих від рЕТ21b і рЕТ32b (варіанти, мічені полігістидином). Освітлений клітинний лізат вносили в заряджену HiTrap Chelating кобальтову колонку зі швидкістю 5 мл/хвилину після урівноваження 20 мМ фосфатом натрію, 500 мМ NaCl і 10 мМ імідазолу, з рівнем pH 7,4. Після завантаження колонку інтенсивно промивали вищезазначеним буфером. Елюювання білка починали з введення 20 мМ фосфату натрію, 500 мМ NaCl і 500 мМ імідазолу з рівнем pH елююючого буфера 7,4. Для контролю проведення очищення застосовували вимірювання спектральної поглинальної здатності при довжині хвилі 280 нм, з використанням хроматографічного інструмента GE Healthcare AKTA Explorer. У процесі елюювання об'єднували фракції, що містять білок-мішень рекомбінантної стрептокінази, що визначали електрофорезом SDS-PAGE, і замінювали буфер для додаткового очищення за допомогою аніонобмінної хроматографії.

Для додаткового очищення елююваної фракції, отриманої з іммобілізованої кобальтової колонки використовували Q-сефарозну колонку 5 мл HiTrap (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ) з врівноваженням 25 мМ Tris-HCl, і 1 мМ EDTA, рівень pH 8,0. Після діалізу протягом ночі проти Q-сефарозного рівноважного буфера об'єднані фракції вносили в Q-сефарозну колонку зі швидкістю 5 мл/хвилину. Після завантаження колонку інтенсивно промивали рівноважним буфером. Білок елюювали з Q-сефарозної колонки шляхом застосування елююючого буфера NaCl (25 мМ Tris-HCl, 1,0 мМ NaCl і 1 мМ EDTA, рівень pH 8,0). Для елюювання білки-мішені використовували градієнт елююючого буфера 0-100 %, який створювали протягом 20 хвилин.

Злитий білок рЕТ41 GST очищали з освітленого клітинного лізату, використовуючи колонку 5 мл GSTrap FF (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ). Освітлений клітинний лізат вносили в колонку з урівноваженням фосфатно-буферним розчином (ФБР). Після завантаження здійснювали рясне промиванням ФБР, і елюювали білок з 50 мМ Tris-HCl і 10 мМ глутатіону, рівень pH 8,0. Ідентифікацію всіх трьох очищених білків підтверджували за допомогою SDS-PAGE, анти-стрептокіназного вестерн-блотингу і аналізів активації.

Фіг. 5 показує приклад очищеної рекомбінантної стрептокінази з фарбуванням Кумасі синім з гелем SDS-PAGE, а також очищеного рекомбінантного плазміногена.

#### Приклад 2

Отримання іммобілізованої міченої полігістидином плазмін-резистентної мутантної стрептокінази

Мічену гістидином (стійку до плазміну) стрептокіназу (100 мкг) в 10 мМ Tris-HCl (рівень pH 8,0) і 100 мМ NaCl додавали до 100 мкл метало-хелатуючої матриці афінності IMAC. Після інкубації при 22°C протягом 5 хвилин кашку переносили в мікроцентрифугальну колонку Spin-X (Costar, Cambridge, MA), забезпечену целолюзно-ацетатним фільтром 0,45 мкм. Матрицю пелетували центрифугуванням при 2,000 x g протягом 3 хвилин і потім декілька разів промивали 20 мМ Tris-HCl з рівнем pH 7,4. Матрицю видаляли з пристрою Spin-X, вміщували в мікроцентрифугальну пробірку і ресуспендували в 200 мл 50 мМ буфера Tris-HCl з рівнем pH 7,4.

#### Приклад 3

##### Отримання плазміногена

Отриманий з плазми плазміноген можна отримувати, наприклад, згідно з описом патентів США № 6964764 і 6969515, які включені в даний винахід за допомогою посилання у всій повноті. Наприклад, плазміноген очищали з пасти Cohn Fraction II+III афінною хроматографією на Lys-сефарозі, як описано авторами Deutsch et al., Science, 170:1095 (1970). А саме, 200 г пасти ресуспендували в 2 літрах 0,15 М буфера цитрату натрію з рівнем pH 7,8. Суспензію інкубували протягом ночі при 37°C, центрифугували при 14000 обертах за хвилину, фільтрували через скловолокло і змішували з 500 мл Lys-сефарози 4B (Pharmacia). Зв'язування плазміногена відбувалося при кімнатній температурі протягом 2 годин. Потім Lys-сефарозу переносили на скляний фільтр об'ємом 2 літри і декілька разів промивали 0,15 М цитрату натрію, що містить 0,3 М NaCl, поки спектральна поглинальна здатність при 280 нм не зменшувалася нижче 0,05. Зв'язаний плазміноген елюювали трьома порціями по 200 мл 0,2 М  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти. Елююваний плазміноген осаджували 0,4 г твердого сульфату амонію на мл розчину плазміногена. Осад з неочищеного плазміногена (з чистотою 80-85 %) можна зберігати при 4°C.

#### Приклад 4

Активация плазміногена в плазмін з використанням іммобілізованої міченої полігістидином плазмін-резистентної мутантної стрептокінази

Еквімолярну кількість плазміногена додавали до іммобілізованої стрептокінази в 50 мМ буфера Тріс-НСІ з рівнем рН 7,4. Зразки культивували при 22°C і вміщували на обертову платформу, для підтримки матриці у вигляді суспензії. Після завершення активації розчин плазміну фільтрували від стрептокінази-СЕФАРОЗИ на скляному фільтрі і негайно переносили на бензамідин-СЕФАРОЗУ.

Для контролю процесу активації плазміногена з різними інтервалами збирали зразки, і завершували реакцію додаванням 0,1 об'єму 10X зупиняючого буфера (1,0 М NaHCO<sub>3</sub>, 1,0 М  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти [рівень рН 9,4]). Зразок переносили в мікроцентрифугальну пробірку Spin-X і пелетували центрифугуванням при 2,000 x g протягом 3 хвилин. Іммобілізовані реагенти елюювали додаванням 25 мл 100 мМ EDTA, з подальшим центрифугуванням при 5,000 x g протягом 10 хв. Зразки готували для аналізу SDS-PAGE додаванням 25 мл SDS буфера 23, що містить  $\beta$ -меркаптоетанол, кип'ятили протягом 5 хвилин і переносили в SDS-10 % поліакриламідний гель.

#### Приклад 5

Активация рекомбинантного плазміногена міченою плазмін-резистентною стрептокіназою в розчині

Очищену рекомбинантну стрептокіназу, отриману з експресією конструкції pET21b, піддавали діалізу проти 25 мм Тріс-НСІ, рівень рН 7,0, 100 мМ  $\epsilon$ -амінокапронової кислоти, 1 мМ EDTA і 25 % гліцерину (об'єм:об'єм). Афінно-очищений рекомбинантний плазміноген змішували в тому ж буфері з рекомбинантною стрептокіназою в молярних співвідношеннях 100:1, 10:1 і 1:1. Кількість стрептокінази в кожній з цих трьох реакцій вважалася сталою, тоді як кількість рекомбинантного плазміногена варіювали, щоб отримати різні молярні відношення рекомбинантного плазміногена до стрептокінази. Ці два компоненти змішували і культивували при кімнатній температурі протягом 18 годин. У точки часу 0, 1, 2, 3, 4 і 18 годин в реакцію активації переносили аліквотну кількість суміші і готували її для електрофорезу SDS-PAGE. Зразки SDS-PAGE обробляли згідно з протоколом підготовки зразків NuPAGE Novex BisTris (Invitrogen, Carlsbad, CA) із застосуванням відновлювальних умов. Для експериментів SDS-PAGE використовували 4-12 % гелі BisTris в буфері MOPS.

Як показано в фіг. 6 для молярного співвідношення 100:1 рекомбинантного плазміногена до рекомбинантної стрептокінази, SDS-PAGE виявив очевидну активацію рекомбинантного плазміногена в рекомбинантний плазмін за допомогою рекомбинантної стрептокінази. Динаміка активації виявила перетворення рекомбинантного плазміногена в рекомбинантний плазмін на початку реакції, що підтверджує утворення двох смуг при відновлювальних умовах PAGE. Смука, що спостерігається, мігрує біля маркера 28 кД, являє собою ділянку протеази серину рекомбинантного плазміногена, тоді як менша смука, мігрує безпосередньо вище маркера 14 кД, є крингл-доменом. Появу цих двох смуг супроводжує зникнення вихідного матеріалу рекомбинантного плазміногена в 39 кД. У точці часу реакції t=18 годин майже весь рекомбинантний плазміноген був перетворений в рекомбинантний плазмін.

Для молярного співвідношення реакції 10:1 застосування SDS-PAGE було можливе тільки для відстеження експерименту, тоді як загальна кількість білка, присутнього в експерименті при молярному співвідношенні 1:1 була дуже малою для контролю SDS-PAGE (дані не показані).

По даних SDS-PAGE гелю, показаних в фіг. 6, очевидно, що очищена рекомбинантна стрептокіназа (конструкція pET 21b) має здатність перетворювати рекомбинантний плазміноген в рекомбинантний плазмін.

Для контролю шляху рекомбинантної стрептокінази в реакціях активації було необхідно стежити за ходом реакції за допомогою вестерн-блотингу. У всіх трьох випадках реакцій спостерігали динаміку гелів SDS-PAGE, як указано вище, і потім переносили їх на мембрани PVDF відповідно до протоколу модуля фарбування Novex X Cell II (Invitrogen, Carlsbad, CA). Блокування мембрани PVDF здійснювали 1 % розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) в фосфатно-буферному розчині (Sigma-P3688, St-Louis, MO), при цьому для всіх розчинів для промивання і розведення антитіл застосовували Тріс-буферний розчин (Sigma-T9039, St-Louis, MO). Після електрофоретичного перенесення і блокування мембрани PVDF досліджували пляму з поліклональним кролячим анти-стрептокіназним антитілом (AbD Serotec (0100-0173), Raleigh, NC) з використанням стокового 1° антитіла в розведенні 1:4000. Для візуалізації фрагментів стрептокінази використовували козячі антикролячі IgG антитіла (Sigma-A3937, St-Louis, MO), мічені лужною фосфатазою, в розведенні 1:5000, в поєднанні з субстратом Sigma Fast BCIP/NBT (Sigma-B5655, St-Louis, MO).

Як показано в фіг. 7, в умовах реакції при культивуванні рекомбинантного плазміногена з рекомбинантною стрептокіназою (молярне співвідношення 100:1), молекули стрептокінази піддавались протеолізу до деяких видів часозалежним чином. Початкове протеолітичне

відсікання видаляло невелику частину поліпептидного скелета, що підтверджувалося вестерн-блотингом по утворенню смуги нижче маркера 51 кД. З плином часу реакції цей фрагмент додатково розщеплювався і проходив через деякі транзиторні види, до утворення стійкого виду, який переміщався вище маркерів ММ 39 і 51 кД. Початкова поява нечіткої смуги в тій же локалізації на плямі була зумовлена крос-реактивністю 1<sup>о</sup> антитіла до повнорозмірного рекомбінантного плазміногена. Обидва з контрольного рекомбінантного плазміногена (смуга 7) і зразка реакції в точці часу  $t=0$  (смуга 1) продемонстрували таку крос-реактивність. При більш тривалому часі реакції з поглинанням рекомбінантного плазміногена відбувалося зменшення нечіткої смуги, і з'являлася нова виразна смуга, що відображає серцевинний фрагмент стрептокінази. Крос-реактивність також була очевидною з доменом рекомбінантного плазміну протеази серину (SP) (дані не показані).

У експерименті з молярним співвідношенням 1:1 швидкість активації була значно знижена (дані не показані). Перші ознаки протеолізу стрептокінази були помітними в точці часу реакції  $t=4$  години. У цих умовах реакції створювався дуже стійкий стрептокіназний фрагмент, навіть на момент реакції  $t=18$  годин. Ймовірно, це було результатом зв'язування всієї присутньої стрептокінази в комплексі з рекомбінантним плазміном, при дуже невеликій кількості вільного рекомбінантного плазміну, доступного для розщеплення молекул рекомбінантної стрептокінази.

Результати показують, що на початку реакції активації рекомбінантна стрептокіназа руйнується на ряд транзиторних видів, але пізніше з плином часу утворює стабільний поліпептид з ММ помітно вище 39 кД.

#### Приклад 6

##### Захоплення плазміну на бензамідин-СЕФАРОЗУ

Афінна хроматографія являє собою корисну технологію очищення білка. Оскільки білок, що розглядається, є активною протеазою серину (тобто, плазміном) з трипсиноподібною специфічністю, як афінний сорбент була вибрана бензамідин-СЕФАРОЗА, яка буде допускати захоплення тільки активного плазміну і ігнорувати різні домішки і продукти розщеплення плазміногена. Захоплення плазміну, елюювання і створення рецептури описані, наприклад, в патенті США № 6355243, який повністю включений у винахід за допомогою посилання.

Повністю активований розчин плазміногена в 50 % гліцерині вносили в колонку 50 мл з бензамідин-СЕФАРОЗОЮ, врівноважували 0,05 М Тріс з рівнем рН 8,0, 0,5 М NaCl при швидкості потоку 3 мл/хвилину. Підтримували колонку при 3 мл/хвилину при 4°C.

#### Приклад 7

##### Елюювання зв'язаного плазміну з буфером з низьким рівнем рН

Для запобігання плазміну від інактивації при нейтральному рівні рН вибирали кислі умови елюювання. Плазмін, пов'язаний з бензамідин-СЕФАРОЗОЮ, елюювали 0,2 М гліциновим буфером, рівень рН 3,0, що містить 0,5 М NaCl. Пік зв'язування звичайно ділиться на три пули: дві невеликих передніх частини піка, В1 і В2, і основна частина елююваного матеріалу, В3.

#### Приклад 8

##### Отримання елююваного матеріалу в окисленій воді

Елююваний плазмін піддавали діалізу водою, яка була окислена, наприклад, до рівня рН від близько 3,3 до близько 3,7 крижаною оцтовою кислотою. Спочатку, такі умови розчинення були вибрані просто для збереження активного плазміну в ході його отримання для майбутніх процедур отримання препарату, таких як ліофілізація, заморожування, зміна умов розчинення і так далі. Всі ці перераховані процедури легше здійснювати з небуферним розчином з низькою іонною силою. Разом з тим, автори даного винаходу виявили, що плазмін надзвичайно стійкий в окисленій воді і може ефективно застосовуватися в цій формі в дослідженнях *in vitro* і *in vivo*.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> TALECRIS BIOTHERAPEUTICS, INC.  
 Koepf, Edward  
 Zimmerman, Thomas P.

<120> КОМПОЗИЦІЯ, СПОСІБ І НАБІР ДЛЯ ОТРИМАННЯ ПЛАЗМІНУ

<130> T126 1240US

<150> PCT/US09/46152

<151> 2009-06-03

<150> 61/058,677

<151> 2008-06-04

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

<213> Streptococcus equisimilis

<400> 1

```

Met Lys Asn Tyr Leu Ser Phe Gly Met Phe Ala Leu Leu Phe Ala Leu
1           5           10           15

Thr Phe Gly Thr Val Asn Ser Val Gln Ala Ile Ala Gly Pro Glu Trp
          20           25           30

Leu Leu Asp Arg Pro Ser Val Asn Asn Ser Gln Leu Val Val Ser Val
          35           40           45

Ala Gly Thr Val Glu Gly Thr Asn Gln Asp Ile Ser Leu Lys Phe Phe
          50           55           60

Glu Ile Asp Leu Thr Ser Arg Pro Ala His Gly Gly Lys Thr Glu Gln
65           70           75           80

Gly Leu Ser Pro Lys Ser Lys Pro Phe Ala Thr Asp Ser Gly Ala Met
          85           90           95

Ser His Lys Leu Glu Lys Ala Asp Leu Leu Lys Ala Ile Gln Glu Gln
          100          105          110

Leu Ile Ala Asn Val His Ser Asn Asp Asp Tyr Phe Glu Val Ile Asp
          115          120          125

Phe Ala Ser Asp Ala Thr Ile Thr Asp Arg Asn Gly Lys Val Tyr Phe
          130          135          140

Ala Asp Lys Asp Gly Ser Val Thr Leu Pro Thr Gln Pro Val Gln Glu
145          150          155          160

Phe Leu Leu Ser Gly His Val Arg Val Arg Pro Tyr Lys Glu Lys Pro
          165          170          175

Ile Gln Asn Gln Ala Lys Ser Val Asp Val Glu Tyr Thr Val Gln Phe
          180          185          190

```

Thr Pro Leu Asn Pro Asp Asp Asp Phe Arg Pro Gly Leu Lys Asp Thr  
195 200 205

Lys Leu Leu Lys Thr Leu Ala Ile Gly Asp Thr Ile Thr Ser Gln Glu  
210 215 220

Leu Leu Ala Gln Ala Gln Ser Ile Leu Asn Lys Asn His Pro Gly Tyr  
225 230 235 240

Thr Ile Tyr Glu Arg Asp Ser Ser Ile Val Thr His Asp Asn Asp Ile  
245 250 255

Phe Arg Thr Ile Leu Pro Met Asp Gln Glu Phe Thr Tyr Arg Val Lys  
260 265 270

Asn Arg Glu Gln Ala Tyr Arg Ile Asn Lys Lys Ser Gly Leu Asn Glu  
275 280 285

Glu Ile Asn Asn Thr Asp Leu Ile Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Leu Lys  
290 295 300

Lys Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Pro Phe Asp Arg Ser His Leu Lys Leu  
305 310 315 320

Phe Thr Ile Lys Tyr Val Asp Val Asp Thr Asn Glu Leu Leu Lys Ser  
325 330 335

Glu Gln Leu Leu Thr Ala Ser Glu Arg Asn Leu Asp Phe Arg Asp Leu  
340 345 350

Tyr Asp Pro Arg Asp Lys Ala Lys Leu Leu Tyr Asn Asn Leu Asp Ala  
355 360 365

Phe Gly Ile Met Asp Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Val Glu Asp Asn His  
370 375 380

Asp Asp Thr Asn Arg Ile Ile Thr Val Tyr Met Gly Lys Arg Pro Glu  
385 390 395 400

Gly Glu Asn Ala Ser Tyr His Leu Ala Tyr Asp Lys Asp Arg Tyr Thr  
405 410 415

Glu Glu Glu Arg Glu Val Tyr Ser Tyr Leu Arg Tyr Thr Gly Thr Pro  
420 425 430

Ile Pro Asp Asn Pro Asn Asp Lys  
435 440

<210> 2  
<211> 440  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> штучна

<400> 2

Met Lys Asn Tyr Leu Ser Phe Gly Met Phe Ala Leu Leu Phe Ala Leu  
1 5 10 15

Thr Phe Gly Thr Val Asn Ser Val Gln Ala Ile Ala Gly Pro Glu Trp  
20 25 30



Leu Leu Asp Arg Pro Ser Val Asn Asn Ser Gln Leu Val Val Ser Val  
 35 40 45  
 Ala Gly Thr Val Glu Gly Thr Asn Gln Asp Ile Ser Leu Lys Phe Phe  
 50 55 60  
 Glu Ile Asp Leu Thr Ser Arg Pro Ala His Gly Gly Lys Thr Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Ser Pro Asn Ser Lys Pro Phe Ala Thr Asp Ser Gly Ala Met  
 85 90 95  
 Ser His Lys Leu Glu Lys Ala Asp Leu Leu Lys Ala Ile Gln Glu Gln  
 100 105 110  
 Leu Ile Ala Asn Val His Ser Asn Asp Asp Tyr Phe Glu Val Ile Asp  
 115 120 125  
 Phe Ala Ser Asp Ala Thr Ile Thr Asp Arg Asn Gly Lys Val Tyr Phe  
 130 135 140  
 Ala Asp Lys Asp Gly Ser Val Thr Leu Pro Thr Gln Pro Val Gln Glu  
 145 150 155 160  
 Phe Leu Leu Ser Gly His Val Arg Val Arg Pro Tyr Lys Glu Lys Pro  
 165 170 175  
 Ile Gln Asn Gln Ala Lys Ser Val Asp Val Glu Tyr Thr Val Gln Phe  
 180 185 190  
 Thr Pro Leu Asn Pro Asp Asp Asp Phe Arg Pro Gly Leu Lys Asp Thr  
 195 200 205  
 Lys Leu Leu Lys Thr Leu Ala Ile Gly Asp Thr Ile Thr Ser Gln Glu  
 210 215 220  
 Leu Leu Ala Gln Ala Gln Ser Ile Leu Asn Lys Asn His Pro Gly Tyr  
 225 230 235 240  
 Thr Ile Tyr Glu Arg Asp Ser Ser Ile Val Thr His Asp Asn Asp Ile  
 245 250 255  
 Phe Arg Thr Ile Leu Pro Met Asp Gln Glu Phe Thr Tyr Arg Val Lys  
 260 265 270  
 Asn Arg Glu Gln Ala Tyr Arg Ile Asn Lys Lys Ser Gly Leu Asn Glu  
 275 280 285  
 Glu Ile Asn Asn Thr Asp Leu Ile Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Leu Lys  
 290 295 300  
 Lys Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Pro Phe Asp Arg Ser His Leu Lys Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Ile Lys Tyr Val Asp Val Asp Thr Asn Glu Leu Leu Lys Ser  
 325 330 335  
 Glu Gln Leu Leu Thr Ala Ser Glu Arg Asn Leu Asp Phe Arg Asp Leu  
 340 345 350  
 Tyr Asp Pro Arg Asp Lys Ala Lys Leu Leu Tyr Asn Asn Leu Asp Ala  
 355 360 365

Phe Gly Ile Met Asp Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Val Glu Asp Asn His  
 370 375 380  
 Asp Asp Thr Asn Arg Ile Ile Thr Val Tyr Met Gly Lys Arg Pro Glu  
 385 390 395 400  
 Gly Glu Asn Ala Ser Tyr His Leu Ala Tyr Asp Asn Asp Arg Tyr Thr  
 405 410 415  
 Glu Glu Glu Arg Glu Val Tyr Ser Tyr Leu Arg Tyr Thr Gly Thr Pro  
 420 425 430  
 Ile Pro Asp Asn Pro Asn Asp Lys  
 435 440

<210> 3  
 <211> 1255  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Штучна

<400> 3  
 ggatcccatc gctggtcccg aatggctctt agaccgtcca tctgtgaata actcccaact 60  
 tgtagtatcc gttgcaggca cgcgcgaagg aaccaaccaa gacatctcct taaaattttt 120  
 tgaaatcgat ttaacctctc gtccctgccca tggcggaaaa accgaacaag gcctctcacc 180  
 aaactctaaa ccttttgcca ccgattcagg agctatgccca cacaaactcg aaaaagccga 240  
 cctcttaaaa gctatccaag aacaacttat cgctaagtga cattcaaattg atgattatctt 300  
 tgaagtaatt gattttgcgt ctgatgccac aattaccgat cgcaatggca aagtctatctt 360  
 tgctgataaa gacggtagcg ttaccttgcc cactcagcca gtacaggaat tcttattatc 420  
 cggccacgtg cgcgtacgtc catataaaga aaaacctatc caaaaccaag caaatcagt 480  
 agatgttgag tataccgtgc agtttacacc gcttaacccc gacgatgatt tccgccttgg 540  
 attaaaagac accaaattac tgaaaacttt agcaattggc gacaccatta cctcacaaga 600  
 actgttagca caagcacaat ctatccttaa caaaacgcac cccggctata ccatttacga 660  
 acgcgactcc tctattgtaa cccacgacaa cgatattttc cgcactattc tgccaatgga 720  
 tcaagaattc acctaccatg taaaaaacgg cgaacaggct tacgaaatta acaaaaaatc 780  
 tgggtttaaac gaagaaatta ataatactga cctgatctca gaaaaatatt acgtgctgaa 840  
 aaaaggagaa aaaccgtatg atccgtttga tcgcagccat ctgaaacttt tcaccatcaa 900  
 atatgtcgat gtaaaccacca acgaactttt aaaatctgaa caattactta ccgcctccga 960  
 acgcaacttg gatttccgtg atctgtacga ccctcgtgat aaagctaaac tcttatacaa 1020  
 caacctggat gcctttggaa ttatggacta tacgttaacc ggcaaagttg aagacaatca 1080  
 cgatgacacc aaccgcatta ttactgttta catggggaaa cggcctgagg gagaaaatgc 1140  
 ctcttatcat cttgcttacg ataatgaccg ctataccgaa gaagaacgcg aagtctatctc 1200

1255

<220>  
<223> Штучна

$\langle 400 \rangle$  4

17

Gly Leu Asn Glu Glu Ile Asn Asn Thr Asp Leu Ile Ser Glu Lys Tyr  
275 280 285

Tyr Val Leu Lys Lys Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Pro Phe Asp Arg Ser  
290 295 300

His Leu Lys Leu Phe Thr Ile Lys Tyr Val Asp Val Asn Thr Asn Glu  
305 310 315 320

Leu Leu Lys Ser Glu Gln Leu Leu Thr Ala Ser Glu Arg Asn Leu Asp  
325 330 335

Phe Arg Asp Leu Tyr Asp Pro Arg Asp Lys Ala Lys Leu Leu Tyr Asn  
340 345 350

Asn Leu Asp Ala Phe Gly Ile Met Asp Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Val  
355 360 365

Glu Asp Asn His Asp Asp Thr Asn Arg Ile Ile Thr Val Tyr Met Gly  
370 375 380

Lys Arg Pro Glu Gly Glu Asn Ala Ser Tyr His Leu Ala Tyr Asp Asn  
385 390 395 400

Asp Arg Tyr Thr Glu Glu Glu Arg Glu Val Tyr Ser Tyr Leu Arg Tyr  
405 410 415

Thr Gly Thr Pro Ile Pro Asp Asn Pro Asn Asp Lys Leu Glu His His  
420 425 430

His His His His  
435

<210> 5  
<211> 589  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Штучна

<400> 5

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp  
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp  
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp  
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn  
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu  
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser  
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly  
100 105 110

Ser	Gly	His	Met	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	115	120	125
Arg	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	130	135	140
His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Met	145	150	155
Ala	Ile	Ser	Asp	Pro	Ile	Ala	Gly	Pro	Glu	Trp	Leu	Leu	Asp	Arg	Pro	165	170	175
Ser	Val	Asn	Asn	Ser	Gln	Leu	Val	Val	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	180	185	190
Gly	Thr	Asn	Gln	Asp	Ile	Ser	Leu	Lys	Phe	Phe	Glu	Ile	Asp	Leu	Thr	195	200	205
Ser	Arg	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Lys	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	210	215	220
Ser	Lys	Pro	Phe	Ala	Thr	Asp	Ser	Gly	Ala	Met	Pro	His	Lys	Leu	Glu	225	230	235
Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Gln	Leu	Ile	Ala	Asn	Val	245	250	255
His	Ser	Asn	Asp	Asp	Tyr	Phe	Glu	Val	Ile	Asp	Phe	Ala	Ser	Asp	Ala	260	265	270
Thr	Ile	Thr	Asp	Arg	Asn	Gly	Lys	Val	Tyr	Phe	Ala	Asp	Lys	Asp	Gly	275	280	285
Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Gln	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	290	295	300
His	Val	Arg	Val	Arg	Pro	Tyr	Lys	Glu	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Gln	Ala	305	310	315
Lys	Ser	Val	Asp	Val	Glu	Tyr	Thr	Val	Gln	Phe	Thr	Pro	Leu	Asn	Pro	325	330	335
Asp	Asp	Asp	Phe	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	340	345	350
Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Ser	Gln	Glu	Leu	Leu	Ala	Gln	Ala	355	360	365
Gln	Ser	Ile	Leu	Asn	Lys	Thr	His	Pro	Gly	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Glu	Arg	370	375	380
Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Thr	His	Asp	Asn	Asp	Ile	Phe	Arg	Thr	Ile	Leu	385	390	395
Pro	Met	Asp	Gln	Glu	Phe	Thr	Tyr	His	Val	Lys	Asn	Arg	Glu	Gln	Ala	405	410	415
Tyr	Glu	Ile	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly	Leu	Asn	Glu	Glu	Ile	Asn	Asn	Thr	420	425	430
Asp	Leu	Ile	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Leu	Lys	Lys	Gly	Glu	Lys	Pro	435	440	445

Tyr Asp Pro Phe Asp Arg Ser His Leu Lys Leu Phe Thr Ile Lys Tyr  
450 455 460

Val Asp Val Asn Thr Asn Glu Leu Leu Lys Ser Glu Gln Leu Leu Thr  
465 470 475 480

Ala Ser Glu Arg Asn Leu Asp Phe Arg Asp Leu Tyr Asp Pro Arg Asp  
485 490 495

Lys Ala Lys Leu Leu Tyr Asn Asn Leu Asp Ala Phe Gly Ile Met Asp  
500 505 510

Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Val Glu Asp Asn His Asp Asp Thr Asn Arg  
515 520 525

Ile Ile Thr Val Tyr Met Gly Lys Arg Pro Glu Gly Glu Asn Ala Ser  
530 535 540

Tyr His Leu Ala Tyr Asp Asn Asp Arg Tyr Thr Glu Glu Glu Arg Glu  
545 550 555 560

Val Tyr Ser Tyr Leu Arg Tyr Thr Gly Thr Pro Ile Pro Asp Asn Pro  
565 570 575

Asn Asp Lys Leu Glu Leu Glu His His His His His His  
580 585

<210> 6

<211> 709

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Штучна

<400> 6

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu  
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu  
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu  
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu  
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
130 135 140

Gly	Asp	His	Val	Thr	His	Pro	Asp	Phe	Met	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	145	150	155	160
Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu	165	170	175	
Val	Cys	Phe	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Pro	Gln	Ile	Asp	Lys	Tyr	180	185	190	
Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	195	200	205	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Ser	210	215	220	
Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Arg		225	230	235	240
Gly	Ser	Thr	Ala	Ile	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	245	250	255	
Arg	Gln	His	Met	Asp	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	260	265	270	
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ser	Pro	Met	Asp	Ile	Gly	Asp	Pro	Ile	Ala	Gly	275	280	285	
Pro	Glu	Trp	Leu	Leu	Asp	Arg	Pro	Ser	Val	Asn	Asn	Ser	Gln	Leu	Val	290	295	300	
Val	Ser	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Gly	Thr	Asn	Gln	Asp	Ile	Ser	Leu	305	310	315	320
Lys	Phe	Phe	Glu	Ile	Asp	Leu	Thr	Ser	Arg	Pro	Ala	His	Gly	Gly	Lys	325	330	335	
Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Pro	Phe	Ala	Thr	Asp	Ser	340	345	350	
Gly	Ala	Met	Pro	His	Lys	Leu	Glu	Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Ile	355	360	365	
Gln	Glu	Gln	Leu	Ile	Ala	Asn	Val	His	Ser	Asn	Asp	Asp	Tyr	Phe	Glu	370	375	380	
Val	Ile	Asp	Phe	Ala	Ser	Asp	Ala	Thr	Ile	Thr	Asp	Arg	Asn	Gly	Lys	385	390	395	400
Val	Tyr	Phe	Ala	Asp	Lys	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Gln	Pro	405	410	415	
Val	Gln	Glu	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	His	Val	Arg	Val	Arg	Pro	Tyr	Lys	420	425	430	
Glu	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Gln	Ala	Lys	Ser	Val	Asp	Val	Glu	Tyr	Thr	435	440	445	
Val	Gln	Phe	Thr	Pro	Leu	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Phe	Arg	Pro	Gly	Leu	450	455	460	
Lys	Asp	Thr	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Ile	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	465	470	475	480

```

Ser Gln Glu Leu Leu Ala Gln Ala Gln Ser Ile Leu Asn Lys Thr His
      485                                490                        495

Pro Gly Tyr Thr Ile Tyr Glu Arg Asp Ser Ser Ile Val Thr His Asp
      500                                505                        510

Asn Asp Ile Phe Arg Thr Ile Leu Pro Met Asp Gln Glu Phe Thr Tyr
      515                                520                        525

His Val Lys Asn Arg Glu Gln Ala Tyr Glu Ile Asn Lys Lys Ser Gly
      530                                535                        540

Leu Asn Glu Glu Ile Asn Asn Thr Asp Leu Ile Ser Glu Lys Tyr Tyr
      545                                550                        555                        560

Val Leu Lys Lys Gly Glu Lys Pro Tyr Asp Pro Phe Asp Arg Ser His
      565                                570                        575

Leu Lys Leu Phe Thr Ile Lys Tyr Val Asp Val Asn Thr Asn Glu Leu
      580                                585                        590

Leu Lys Ser Glu Gln Leu Leu Thr Ala Ser Glu Arg Asn Leu Asp Phe
      595                                600                        605

Arg Asp Leu Tyr Asp Pro Arg Asp Lys Ala Lys Leu Leu Tyr Asn Asn
      610                                615                        620

Leu Asp Ala Phe Gly Ile Met Asp Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Val Glu
      625                                630                        635                        640

Asp Asn His Asp Asp Thr Asn Arg Ile Ile Thr Val Tyr Met Gly Lys
      645                                650                        655

Arg Pro Glu Gly Glu Asn Ala Ser Tyr His Leu Ala Tyr Asp Asn Asp
      660                                665                        670

Arg Tyr Thr Glu Glu Glu Arg Glu Val Tyr Ser Tyr Leu Arg Tyr Thr
      675                                680                        685

Gly Thr Pro Ile Pro Asp Asn Pro Asn Asp Lys Leu Glu His His His
      690                                695                        700

His His His His His
      705

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Стрептокіназа, іммобілізована на матриці, яка активує плазміноген в плазмін, при цьому залишаючись стійкою до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу, яка містить амінокислотну послідовність, що має аспарагін в положеннях, які відповідають положенням 85 і 412 в SEQ ID NO:1.
- 10 2. Матриця, яка має іммобілізовану на ній стрептокіназу, для активації плазміногена в плазмін, в якій вказана стрептокіназа, що є стійкою до розщеплення плазміном в порівнянні з відповідною їй стрептокіназою дикого типу, містить амінокислотну послідовність, що має аспарагін в положеннях, які відповідають положенням 85 і 412 в SEQ ID NO:1.
3. Спосіб отримання плазміну, який включає:
  - а) контактування стрептокінази, іммобілізованої на матриці, вказаній у п. 1, або матриці, яка має іммобілізовану на ній стрептокіназу, вказану у п. 2, з плазміногеном, таким чином перетворюючи плазміноген в плазмін; і
- 15



b) очищення плазміну.

4. Спосіб за п. 3, в якому стрептокіназа містить амінокислотну послідовність, представлену амінокислотними залишками 27-440 послідовності SEQ ID NO:1, що має аспарагін в положеннях 85 і 412.

5. Спосіб за п. 3, в якому очищення включає контактування плазміну, одержаного на етапі а), з плазмінзв'язувальною матрицею таким чином, що плазмін утримується плазмінзв'язувальною матрицею, при цьому на плазмінзв'язувальній матриці розташована молекула, яка має афінність доплазміну.

6. Спосіб за п. 3, в якому стрептокіназа, необов'язково, додатково містить полярні або заряджені залишки в одному або декількох положеннях, які відповідають положенням 406-410 в SEQ ID NO:1.

7. Набір для отримання плазміну, який містить:

а) стрептокіназу, іммобілізовану на матриці, вказану у п. 1, і

б) плазмінзв'язувальну матрицю з розташованою на ній молекулою, що має афінність до плазміну.

**(SEQ ID NO:3)**

ggatcccATCGCTGGTCCCGAATGGCTCTTAGACCGTCCATCTGTGAATAACTCCCAACTTGTAGTATC  
CGTTGCAGGCACCGTCGAAGGAACCAACCAAGACATCTCTTAAAAATTTTGTAAATCGATTTAAC  
CTCTCGTCTGCCCCATGGCGGAAAAACCGAACAAGGCCTCTCACCAAACTCTAAACCTTTTGCCAC  
CGATTACGGAGCTATGCCACACAAACTCGAAAAAGCCGACCTCTTAAAAGCTATCCAAGAACAAC  
TTATCGCTAATGTACATTCAAATGATGATTATTTTGAAGTAATTGATTTTGGCTCTGATGCCACAAT  
TACCGATCGCAATGGCAAAGTCTATTTTGTGATAAAGACGGTAGCGTTACCTTGCCCACTCAGCC  
AGTACAGGAATTCTTATTATCCGGCCACGTGCGGTACGTCCATATAAAGAAAAACCTATCCAAAA  
CCAAGCAAAATCAGTAGATGTTGAGTATACCGTGCAGTTTACACCGCTTAACCCCGACGATGATT  
CCGCCCTGGATTAAAAAGACACCAAAATTACTGAAAACCTTTAGCAATTGGCGACACCATTAACCTCACA  
AGAACTGTAGCACAAGCACAATCTATCCCTTAACAAAAACGCAOCCCGGCTATACCATTTACGAACG  
CGACTCTCTATTGTAACCCACGACAAOGATATTTCCGCACTATTCTGCCAATGGATCAAGAATT  
CACCTACCATGTAAAAAACCGCGAACAGGCTTACGAAATTAACAAAAATCTGGTTTAAACGAAG  
AAATTAATAATACTGACCTGATCTCAGAAAAATATTACGTGCTGAAAAAAGGAGAAAAACCGTAT  
GATCCGTTTGTATCGCAGCCATCTGAAAACCTTTTACCATCAAATATGTCGATGTAAACACCAACGAA  
CTTTTAAATCTGAACAATTACTTACCGCCTCCGAACGCAACTTGGATTTCGGTGATCTGTACGACC  
CTCGTGATAAAGCTAAACTCTTATACAACAACCTGGATGCCTTTGGAATTATGGACTATACGTTAA  
CCGGCAAAGTTGAAGACAATCACGATGACACCAACCGCATTATTACTGTTTACATGGGGAAACGG  
CCTGAGGGGAGAAAAATGCCTCTTATCATCTTGCTTACGATAATGACCGCTATACCGAAGAAGAACGC  
GAAGTCTATTCTATCTGCGCTATACTGGAACACCTATCCCCGACAACCTAATGACAAAActcgag

Фіг. 1

(SEQ ID NO:4)

MASMTGGQOM GRDPIAGPEW LLDRPSVNN S QLVVSVAGTV EGTNQDISLK FFEIDLTSRP  
 AHGGKTEOGL SPNSKPFATD SGAMPHKLEK ADLLKAIOEQ LIANVHSNDD YFEVIDFASD  
 ATITDRNGKV YFADKDGSVT LPTQPVQEF LSGHVRVRPY KEKPIQNQAK SVDVEYTVQF  
 TPLNPDDDFR PGLKDTKLLK TLAIGDTITS QELLAQAQSI LNKTHPGYTI YERDSSIIVTH  
 DNDIFRTILP MDQEFTYHVK NREQAYEINK KSGLNEEINN TDLISEKYYV LKKGEKPYDP  
 FDRSHLKLFT IKYVDVNTNE LLKSEQLLTA SERNLDFRDL YDPRDKAKLL YNNLDAFGIM  
 DYTTLTGKVED NHDDTNRIIT VYMGRPEGE NASYHLAYDN DRYTEEEREV YSYLRYTGTP  
 IPDNPNDKLE HHHHHH

Fig. 2

(SEQ ID NO:5)

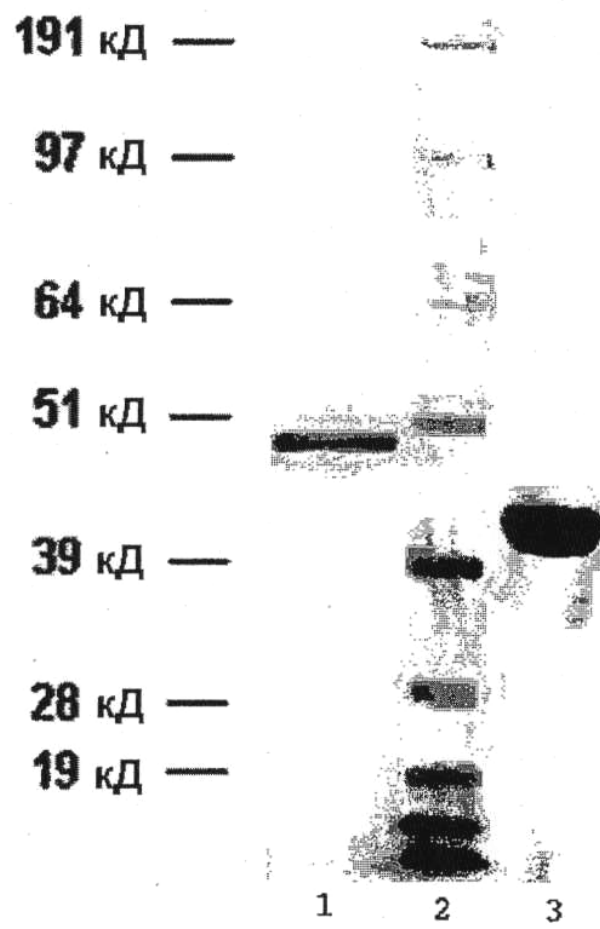
MSDKIIHLTD DSFDTDVLRA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEY OGKLTVAKLN  
 IDQNPGTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQL KEFLDANLAG SGSGHMHMHH  
 HHSSGLVPRG SGMKETAAAK FERQHMDSPD LGTDDDDKAM AISDPIAGPE WLLDRPSVNN  
 S QLVVSVAGT VEGTNQDISL KFFEIDLTSR PAHGGKTEQG LSPNSKPFAT DSGAMPHKLE  
 KADLLKAIOE QLIANVHSND DYFEVIDFAS DATITDRNGK VYFADKDGSV TLPTQPVQEF  
 LLSGHVRVRP YKEKPIQNQA KSVDVEYTVQ FTPLNPDDDF RPLKDTKLL KTLAIGDTIT  
 SQELLAQAQS ILNKTHPGYT IYERDSSIIVT HDNDIFRTIL PMDQEFTYHV KNREQAYEIN  
 KSGLNEEIN NTDLISEKYY VLKKGEKPYD PFDRSHLKLFT TIKYVDVNTN ELLKSEQLLT  
 ASERNLDFRD LYDPRDKAKL LYNNLDAFGI MDYTTLTGKVE DNHDDTNRII TVYMGRPEGE  
 ENASYHLAYD NDRYTEEERE VYSYLRYTGT PIPDNPNDKL ELEHHHHHHH

Fig. 3

(SEQ ID NO:6)

MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID  
 GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV  
 DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK  
 KRIEAIPOID KYLKSSKYIA WPLQGWOATF GGGDHPPKSD GSTSGSGHHH HHHSAGLVPR  
 GSTAIGMKET AAARKFERQHM DSPDLGTGGG SGDDDDKSPM DIGDPIAGPE WLLDRPSVNN  
 SOLVVSVAGT VEGTNODISL KFFEIDLTSR PAHGGKTEQG LSPNSKPFAT DSGAMPHKLE  
 KADLLKAIQE QLIANVHSND DYFEVIDFAS DATITDRNGK VYFADKDGSV TLPTQPVQEF  
 LLSGHVRVRP YKEKPIONQA KSV DVEYTVQ FTPLNPDDDF RPGLKDTKLL KTLAIGDTIT  
 SQELLAQAQS ILNKTHPGYT IYERDSSIIVT HDNDIFRTIL PMDQEFTYHV KNREQAYEIN  
 KKSGLNEEIN NTDLISEKYY VLKKGEKPYD PFDRSHLKL F TIKYVDVNTN ELLKSEQLLT  
 ASERNLDFRD LYDPRDKAKL LYNNLDAFGI MDYTLTGKVE DNHDDTNRII TVYMGKRPEG  
 ENASYHLAYD NDRYTEEERE VYSYLRYTGT PIPDNPNDKL EHHHHHHHH

Fig. 4



Фиг. 5

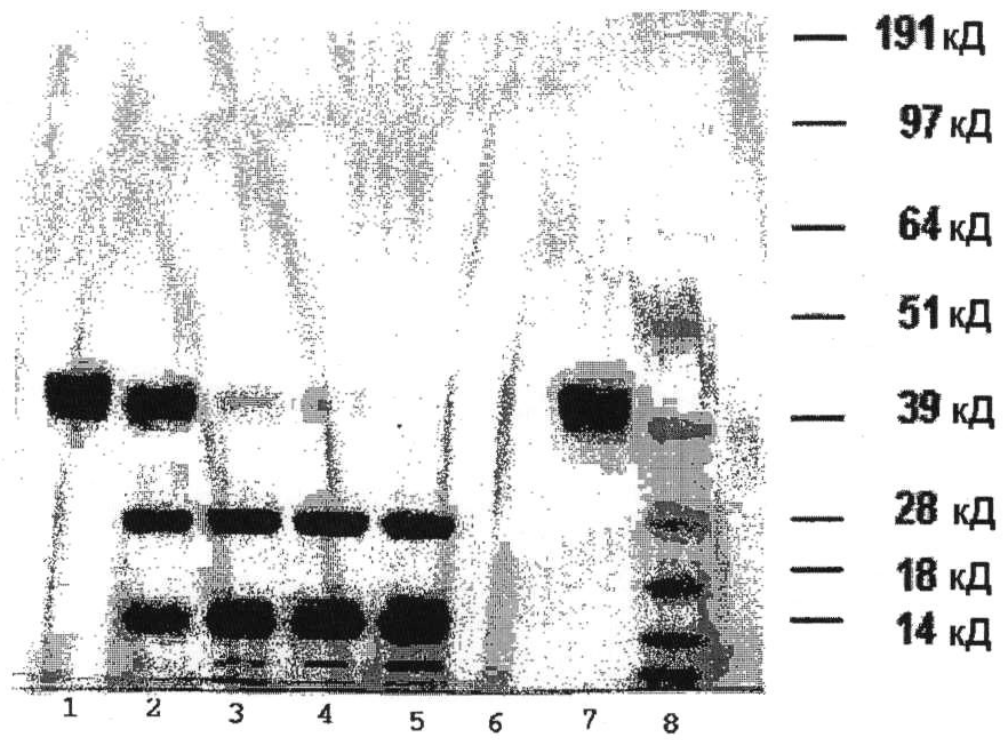


Fig. 6

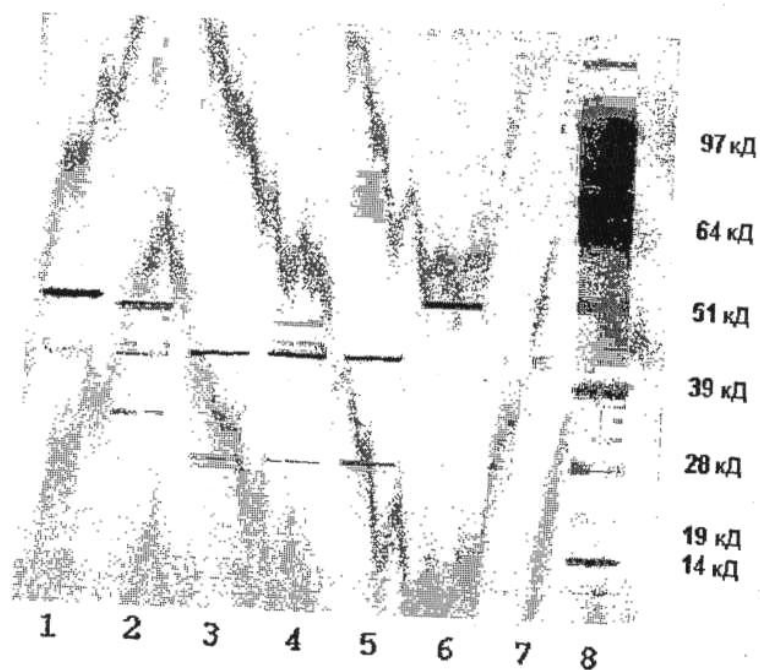


Fig. 7

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601