



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 134 696** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 07 K 14/775, A 61 K 38/16**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

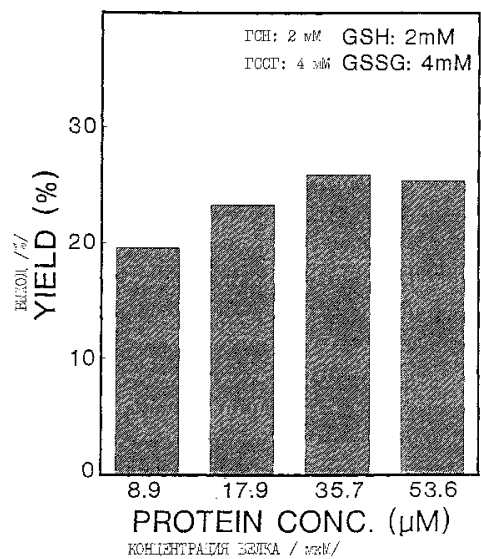
(21), (22) Заявка: 93054168/14, 11.12.1992
(30) Приоритет: 13.12.1991 SE 9103701-0
(46) Дата публикации: 20.08.1999
(56) Ссылки: WO 90/12879 A2, 01.11.90. EP 0267703 A1, 18.05.88. Препарат фирмы Берингер Ингельхайм "Актелизе". Регистрационное удостоверение Минздрава РФ П-8-242 N 01859 от 01.06.90.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 12.08.93
(86) Заявка PCT: SE 92/00858 (11.12.92)
(87) Публикация PCT: WO 93/12143 (24.06.93)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул.Б.Спасская, д.25, стр.3, ООО "Союзпатент", Патентному поверенному начальнику отдела прикладной химии и медицины г-же Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
Каби Фармация АБ (SE)
(72) Изобретатель: Чезаре Чиртори (IT), Гвидо Франческини (IT), Ларс Абрамсен (SE), Эрик Холмгрен (SE), Матс Лаке (SE), Бьерн Нильссон (SE), Йоанна Кмиелевска (SE), Петер Линд (SE)
(73) Патентообладатель:
Каби Фармация АБ (SE)

(54) ДИМЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО ВАРИАНТА АПО-ЛИПОПРОТЕИНА, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ЕГО ОСНОВЕ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине и может быть использовано при получении димера молекулярного варианта апо-липопротеина AI-Milano и применении его для изготовления лекарств при профилактике и лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Заявленный димер характеризуется чистотой по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 98%. Димер апо-липопротеина AI-Milano получают из крови носителей или при помощи рекомбинантной технологии в экспрессионной системе в E. coli или в виде внутриклеточного слитого белка в E. coli. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного начала димер

апо-липопротеина, дополнительно может содержать носитель и/или стабилизирующее соединение, предпочтительно липидное, и/или агент, снижающий содержание липидов в организме. Фармацевтическая композиция, содержащая димер, может быть использована для лечения атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, как пролекарство для мономера апо-липопротеина, для предотвращения тромбозов. Способ позволяет получить димер апо-липопротеина, по существу, в чистой форме, обладающий продленным периодом полураспада в плазме и улучшенной возможностью способствовать расщеплению фибрина в организме по сравнению с мономером. 6 с. и 21 з.п.ф-лы, 13 ил., 8 табл.



Фиг.1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 134 696** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁶ **C 07 K 14/775, A 61 K 38/16**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 93054168/14, 11.12.1992
 (30) Priority: 13.12.1991 SE 9103701-0
 (46) Date of publication: 20.08.1999
 (85) Commencement of national phase: 12.08.93
 (86) PCT application:
 SE 92/00858 (11.12.92)
 (87) PCT publication:
 WO 93/12143 (24.06.93)
 (98) Mail address:
 129010, Moskva, ul.B.Spaskaja, d.25, str.3,
 OOO "Sojuzpatent", Patentnomu poverennomu
 nachal'niku otdela prikladnoj khimii i
 meditsiny g-zhe Lebedevoj N.G.

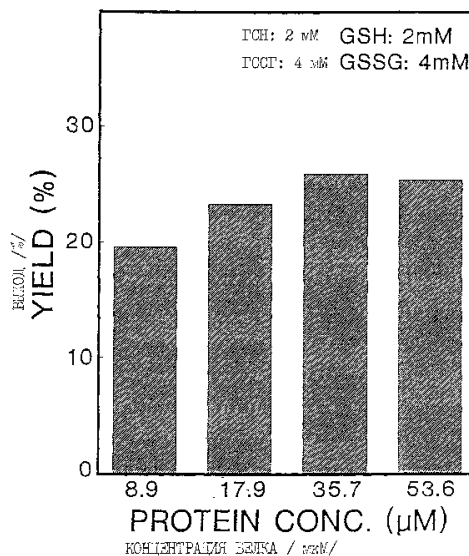
(71) Applicant:
 Kabi Farmatsia AB (SE)
 (72) Inventor: Chezare Chirtori (IT),
 Guido Francheskini (IT), Lars Abramsen
 (SE), Ehrik Kholmogren (SE), Mats Lake
 (SE), B'ern Nil'sson (SE), Joanna Kmielevska
 (SE), Peter Lind (SE)
 (73) Proprietor:
 Kabi Farmatsia AB (SE)

(54) DIMER OF MOLECULAR VARIANT OF APO-LIPOPROTEIN, METHOD OF ITS PREPARING AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION ON SAID

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to preparing dimer of molecular variant of apo-lipoprotein AI-Milano that can be used for making drugs used for prophylaxis and treatment of patients with atherosclerosis and cardiovascular diseases. The claimed dimer exhibits purity, at least 90%, but preferably at least 98%. Dimer of apo-lipoprotein AI-Milano is prepared from donor blood or by recombinant technology in an expression system in E. coli or as an intracellular fused protein in E. coli. Pharmaceutical composition containing dimer of apo-lipoprotein as an active component can has additionally a carrier and/or stabilizing agent, preferably of lipid nature, and/or an agent decreasing lipid content in the body. Dimer-containing pharmaceutical composition can be used for treatment of patients with atherosclerosis and cardiovascular diseases as prodrug for apo-lipoprotein monomer for thrombosis prophylaxis. Method ensures to obtain dimer of apo-lipoprotein as a pure form showing the prolonged half-time period in plasma and

improved capability to promote fibrin splitting in the body as compared with that of monomer. EFFECT: improved properties and effectiveness of dimer. 27 cl, 13 dwg, 9 tbl, 10 ex



Фиг.1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

Изобретение относится к, по существу, чистому димеру аро-липопротеина AI-Milano/Аро AI-M/Аро-M/ и фармацевтическим составам, содержащим этот димер. Оно также относится к способу его получения путем рекомбинантной техники, а также путем выделения из плазмы. Этот продукт может быть использован для лечения атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний; назначение Аро AI-M может быть способом замедления действия другого лекарства.

Предшествующий уровень техники.

Явная связь между повышенными уровнями холестерина в сыворотке крови и развитием болезней венечной артерии сердца /БВАС/ неоднократно подтверждалось данными, основанными на эпидемиологических исследованиях и исследованиях продольного разреза сердца. Однако определение сложных механизмов транспорта холестерина в плазме позволило признать избирательную функцию липопротеинов в кровеносной системе и установлении риска БВАС.

В действительности существует 4 основных липопротеина кровеносной системы: шарики жиров, которые появляются в крови во время переваривания жирсодержащей пищи /ШЖ/, липопротеины с очень низкой плотностью /ЛОНП/, липопротеины с низкой плотностью /ЛНП/ и липопротеины с высокой плотностью /ЛВП/. В то время как ШЖ представляет собой коротко живущий продукт кишечного всасывания жиров, ЛОНП и в особенности ЛНП ответственны за транспорт холестерина в ткани, включающие, например, стенки артерий. В отличие от них ЛВП прямо вовлечены в удаление холестерина из периферических тканей путем перенесения их обратно либо в печень, либо к другим липопротеинам при помощи механизма, известного как "обратный транспорт холестерина" /ОТХ/.

"Защитная" роль ЛВП подтверждена в ряде исследований /например, Meller et al, Lancet, 1977: 965 - 968 и Whyne et al, Atherosclerosis, 1981; 39:411 - 419/. В этих исследованиях повышенные уровни ЛНП и в меньшей степени ЛОНП представляются явно связанными с увеличенным сердечно-сосудистым риском, тогда как высокие уровни ЛВП, по-видимому, придают сердечно-сосудистую защиту. Защитная роль ЛВП в дальнейшем была сильно поддержана исследованиями *in vivo*, показывающими, что внутривенные вливания ЛВП кроликам могут препятствовать развитию артериальных повреждений, вызванных холестерином /Badimon et al, Lab. Invest., 60, 455 - 61, 1989/, и/или способствовать их возвращению в прежнее состояние /Badimon et al, J. Clin Invest., 85, 1334 - 41, 1998/.

В настоящее время интерес в исследованиях защитного механизма(ов) ЛВП сосредоточен на аро-липопротеине AI /Аро AI/, основном компоненте ЛВП. Высокие уровни Аро AI в плазме связаны с уменьшенным риском БВАС и наличием повреждений венечной артерии /Maciejko et al, N Engl J. Med., 1983; 309: 385 - 389, Sedlis et al, Circulation, 1986; 73: 978 - 984/.

Плазменный Аро AI является отдельной полипептидной цепью из 243 аминокислот,

первичная последовательность которых известна /Brewer et al, Biochem Biophys Res Commun. 1978; 80:623 - 630/. Аро AI синтезируется в клетке в виде предшественника из 267 аминокислот. Этот пред-аро-липопротеин подвергается N-концевому расщеплению - сначала внутриклеточному, где теряются 18 аминокислот, а затем дальнейшему отщеплению 6 аминокислот в плазме или лимфе при участии активности специфических протеаз.

Полагают, что основным требованием к структуре молекулы Аро AI является наличие повторяющихся единиц из 11 или 22 аминокислот, которые предпочтительно нужны для создания амфипатической спиральной конформации /Segrest et al, FEBS Lett 1974, 38: 247-253/. Эта структура позволяет осуществляться главным биологическим активностям Аро AI, а именно связыванию липидов и активации лецитин-холестерин-ацилтрансферазы /ЛХАТ/.

Другим недавно описанным свойством Аро AI является его антивирусная активность. О ней сообщалось по данным исследований *in vitro*; она осуществляется и против штаммов герпесного вируса /Srinivas R.V. et al, Virology. 1756, 48-57, 1990/, и также против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) /Owe et al, J. Chin Invest, 86, 1142-50, 1990/. По-видимому, эта активность осуществляется путем взаимодействия между амфипатическими спиральными участками Аро AI и гликопротеинами оболочки вирусов.

Исследования *in vitro* показывают, что комплексы Аро AI и лецитина могут способствовать удалению свободного холестерина из культивируемых клеток артериальных гладких мышц /Stein et al, Biochem. Biophys. Acta. 1975; 380: 106-118/. При помощи этого механизма ЛВП также может уменьшить быстрое размножение этих клеток /Yoshida et al, Exp. Mol. Pathol. 1984; 41:258-266/.

Также было показано, что внутривенное вливание Аро AI или ЛВП экспериментальным животным вызывает значительные биохимические изменения, а также уменьшение протяженности и силы атеросклеротических повреждений. После первого сообщения, сделанного Maciejko и Mao /Arteriosclerosis, 1982: 2:407a/, Vadimon и др. /смотри две работы, процитированные выше/ обнаружили, что эти вещества могут значительно уменьшить протяженность атеросклеротических повреждений /-45%/, а внутривенное вливание ЛВП /d = 1,063-1,325 г/мл/ кроликам, которых кормили холестерином, значительно снижает у них содержание эфира холестерина /-58,5%/. Эти исследования также нашли, что внутривенное вливание ЛВП приводит к возвращению в исходное состояние /почти на 50%/, установившихся повреждений. Также была возможность показать /Esper et al, Arteriosclerosis 1987; 7:523a/, что внутривенные вливания ЛВП могут заметно изменить состав липопротеинов в плазме кроликов Watanabe с наследственным повышенным содержанием холестерина в крови, у которых развиваются ранние артериальные повреждения. У этих кроликов внутривенные вливания ЛВП могут

более чем удвоить соотношение между защищающим ЛВП и ЛНП, который способствует атеросклерозу.

Возможность с помощью ЛВП предотвратить артериальные заболевания на моделях животных далее была поддержана наблюдением того, что Аро AI может осуществлять *in vitro* активность, расщепляющую фибрин /Saku et al, Thromb. Res. , 1985; 39:1-8/. Роннебергер /Xth Int. Congr. Pharmacol., Sidney, 1987, p. 990/ продемонстрировал, что экстрагированный Аро AI может увеличивать расщепление фибрина у собак-ищейек и у *Сynomologous* обезьян. Похожая активность была отмечена *in vitro* в плазме человека. Этот исследователь смог подтвердить уменьшение липидных отложений и образования артериальных бляшек у животных, обработанных Аро AI.

Аро-липопротеин AI-Milano /Аро AI-M/ является первым описанным молекулярным вариантом человеческого Аро AI /Franceschini et al., J.Clin. Invest., 1980; 66: 892-900/. Он отличается замещением А 173 на Су /Weisgraber et al., J. Mol. Chem. , 1983; 258: 2508-2513/. Мутантный аро-протеин передается как аутосомный доминантный признак, и было идентифицировано 8 поколений носителей /Gualandri et al., Am. J. Hum. Genet, 1984; 37:1083-1097/.

Состояние индивидуального носителя Аро AI-M отличается замечательным снижением уровня холестерина, связанным с ЛВП. Несмотря на это организмы, имеющие этот признак, с очевидностью не показали какого-либо повышенного риска артериальных заболеваний; разумеется, из проверки их генеалогического древа явствовало, что эти организмы могут считаться "защищенными" от атеросклероза.

Механизм возможного защитного эффекта Аро AI-M у носителей, по-видимому, связан с изменением структуры мутантного аро-липопротеина из-за потери одной альфа-спирали и увеличенного обнажения гидрофобных остатков /Francheschini et al, J. Biol. Chem. 1985; 260: 1632-1635/. Потеря сжатой структуры многочисленных альфа-спиралей приводит к увеличению гибкости молекулы, которая легче соединяется с липидами по сравнению с нормальным AI. Более того, комплексы аро-липопротеина с липидами более чувствительны в отношении денатурации, таким образом подтверждая, что снабжение липидами также улучшено в случае мутантов.

Другой очень специфической чертой Аро AI-M является его способность образовывать собственные димеры и комплексы с Аро AII, в обоих случаях из-за присутствия Суs-остатка. Из исследований фракций крови, содержащих смесь аро-липопротеинов, получены указания на то, что присутствие димеров и комплексов в кровеносной системе может быть ответственным за увеличение времени полураспада, удаляющего аро-липопротеины, у носителей, недавно описанных в клинических исследованиях /GREGG et al., NATO ARW on Human Apolipoprotein Mutants: From Gene Structure to Phenotypic Expression, Limone, 1988/.

Димеры Аро AI-M /Аро AI-M/Аро AI-M/ действуют как подавляющий фактор взаимных превращений частиц ЛВП *in vitro*

/Franceschini et al., J.Biol Chem., 1990; 265: 12224-12231/.

Ранние исследования смесей, содержащих димер, были основаны на Аро-AI-M, выделенном из натуральной крови людей с признаком Аро AI-M, и, таким образом, белок мог быть получен только в небольших количествах.

Трудность получения Аро AI и особенно Аро AI-M из фракционированной плазмы весьма значительна /Franceschini et al., J. Biol. Chem., 1985; 260: 16321-16325/. Выделение и получение не может быть проведено в большом масштабе, поскольку только небольшое количество неочищенного материала имеется в распоряжении исследователя. Более того, существует определенный риск, связанный с продуктами фракционированной плазмы, такой как загрязнение инфекционными агентами. Все это настолько существенно, что лучше этого избежать.

Были сделаны попытки получить человеческий Аро AI при помощи техники рекомбинантной ДНК. В опубликованном европейском патенте N 0267703 описано получение Аро AI из *E.Coli*. Процесс представляет химерные полипептиды, в которых группы Аро AI слиты с N-концевым аминокислотным остатком бета-галактозидазы или с одной или более областей, связывающих IgG, белка А или с предпоследовательностью человеческого Аро AI.

Экспрессия Аро AI и Аро AI-M в штаммах дрожжей и использование полученных соединений в лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний раскрыто в W090/12879. Гены, кодирующие Аро AI и Аро AI-M, расположены на последовательности ДНК, которая кодирует выделение, узнаваемое в клетках дрожжей, и сигналы процессинга, присоединенные выше генов, кодирующих зрелые белки. В данном исследовании была использована измененная лидирующая последовательность MF-альфа-1, в которой последними остатками являются: His Gly Sor Leu Asp Lys Arg.

Настоящее изобретение.

В настоящее время мы неожиданно обнаружили, что очищенный димер Аро AI-M/Аро AI-M имеет продленный период полураспада в плазме по сравнению с мономером Аро AI-M; далее, что он имеет заметно улучшенное свойство способствовать расщеплению фибрина в сравнении с нормальным Аро AI, например его способность к прямой активации плазминогена /чего нормальный Аро AI-M делать не может/ - наблюдение, которое может иметь биологическую важность - и также возможность действовать в качестве про-лекарства для Аро AI-M. Димер также образует вновь составленные частицы ЛВП /липопротеин с высокой плотностью/ одинакового размера, которые не обнаружены среди частиц рекомбинантного ЛВП, содержащих Аро AI-M или Аро AI.

Настоящее изобретение относится к, по существу, чистому димеру аро-липопротеина Аро-Milano, впоследствии называемому Аро AI-M/Аро AI-M, с чистотой по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 98%, который сначала был выделен из плазмы и охарактеризован, а затем был также получен

рекомбинантными методами. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим составам, включающим Аро AI-M/Аро AI-M, вместе /что необязательно/ со стабилизирующим агентом, например стабилизирующее липидное соединение, такое как фосфолипид и/или носитель.

Фармацевтические составы также могут содержать агент, снижающий содержание липидов и/или другой лекарство, уже известное в лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, такое как гепарин, фракции гепарина и фрагменты гепарина или агенты, снижающие содержание липидов.

Аро-липопротеин Аро AI-M можно получить:

а) образованием аро-липопротеина AI-Milano путем рекомбинантной технологии в виде внутриклеточного слитого белка E.coli, отщеплением аро-липопротеина AI-Milano с помощью муравьиной кислоты и после этого превращением любого присутствующего мономера в димер, или

б) образованием аро-липопротеина AI-Milano путем рекомбинантной технологии, по которой аро-липопротеин AI-Milano, мономер или димер выделяется в среду бактериальной культуры в экспрессионной системе E.Coli, и любой присутствующий мономер после этого превращается в димер, в обоих случаях последним этапом является очистка димера до в основном чистой формы.

В соответствии с а) Аро AI-M образуется в виде слитого белка внутри клеток бактерий. Партнером по слиянию является измененная область белка А, которая связывается с ИГГ, а сайт расщепления муравьиной кислотой по замыслу находится между партнером по слиянию и Аро AI-M. После лизисов бактерий слитый белок очищается на иммобилизованном ИГГ и расщепляется муравьиной кислотой. Присутствие Аро AI-M и его димера было показано методом Вестерн-блоттинга на СДС-гель-электрофорезе.

В примере 3 показано, что искусственный Аро AI-M может быть получен в рекомбинантной E. coli и что образуются димеры. Однако использование муравьиной кислоты дает продукт, сокращенный на две аминокислоты с его N-конца. Предполагается, что такое сокращение не изменяет активности молекулы Аро AI-M.

Система в соответствии с б) показана в примере 4, в котором образуется полная правильная молекула.

Заявляемый димер Аро AI-M также можно получить:

с) сбором плазмы у носителей аро-липопротеина AI-Milano, выделением аро-липопротеина ЛВП, отделением димера при помощи хроматографии, например хроматографией на Сефакриле в несколько этапов, или

д) сбором плазмы у носителей аро-липопротеина AI-Milano, очисткой мономера и после этого превращением его в димер, а затем очисткой димера до по существу чистой формы.

Важным является то, что разделение в соответствии с с) осуществляется в несколько этапов, предпочтительно на длинной колонке, такой как 300 см.

Если присутствует мономер, то его всегда следует превращать в форму димера, как показано в нижеприведенных примерах.

Настоящее изобретение включает способ лечения атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, а также использование димера в приготовлении лекарств. Димер также может действовать как про-лекарство мономера при лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Эти лекарства могут быть использованы для лечения атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, а также для предотвращения и лечения основных заболеваний сердца и кровеносной системы, таких как инфаркт миокарда, неустойчивая ангина, внезапные закупорки периферических сосудов, и во время восстановительного периода после пластических операций на венозных сосудах.

Когда осуществляется лечение хронических артериальных заболеваний, то лечатся и венозные и также периферические артерии, которые характеризуются закупоривающими бляшками. Димеры сами по себе будут использоваться для внутривенных вливаний с целью вызвать удаление жиров из бляшек или в соединении /что необязательно/ с уже назначенным лечением атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний, таким как использование гепарина, фракций гепарина и фрагментов гепарина и/или лекарств, уменьшающих уровни в кровеносной системе липопротеинов, вызывающих атеросклероз.

Лекарства, содержащие димер, могут быть использованы для предотвращения и лечения тромбозов в различных клинических ситуациях, а также для стимуляции расщепления фибрина.

В димере Аро AI-M с высоким содержанием присутствуют амфипатические структуры, и предполагается, что димер обладает противовирусной активностью.

Сейчас на первое время путем использования настоящего изобретения возможно получать димер в, по существу, чистой форме - более 90% и даже выше чем 98%, а также продемонстрировать, что этот продукт обладает удивительно улучшенным действием на биологические системы по сравнению с Аро AI, которое показано в примерах 7-10, приведенных ниже.

Фиг. 1 и 2 иллюстрируют зависимость выхода в % от концентрации белка /пример 2б/.

Фиг. 3 иллюстрирует кинетику образования Аро AI-M/Аро AI-M в течение 24 часов /примеры 1б, 2/.

Фиг. 4 показывает синтетический линкер /пример 3а/.

Фиг. 5 показывает плазмиду /пример 3а/.

Фиг. 6 иллюстрирует Вестерн-анализ после расщепления слизистого белка /пример 3д/.

Фиг. 7 иллюстрирует УФ-спектр Аро AI-M/Аро AI-M /пример 5/.

Фиг. 8-10 иллюстрируют вторую производную УФ-спектра /пример 5/.

Фиг. 11 иллюстрирует флуоресцентную спектроскопию /пример 5/.

Фиг. 12 иллюстрирует КД-спектроскопию /пример 5/.

Фиг. 13 иллюстрирует рЛВП, содержащий

Аро АI, Аро АI-М и Аро АI-М/Аро АI-М /пример 6/.

Экспериментальная часть.

Пример 1. Выделение димера из плазмы.

а). Приготовление аро-липопротеинов.

Образцы крови, взятые натощак у различных носителей аро-липопротеина Аро АI-М, собирали в раствор $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ /1 мг/мл/, и готовили плазму путем центрифугирования с низкой скоростью при 4 °С. Плазменные липопротеины с высокой плотностью /ЛВП, $d = 1,063\text{-}1,21$ г/мл/ выделяли последовательным ультрацентрифугированием /Хавел Р.Ж., Эдер Х.А., Брэгдон Ж.Х. Распределение и химический состав липопротеинов сыворотки человека, разделенных ультрацентрифугированием. J. Clin. Invest., 1955; 34: 1345-1354/ на ультрацентрифуге Beckman L5-50В, снабженной ротором 50,2 Ti. После ультрацентрифугирования в течение 48 часов при 40000 об/мин при 4°С верхнюю фракцию, содержащую ЛВП, разводили в соотношении 1:1 раствором 0,15 М NaCl, 0,01% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, КВ /рН 7,4, $d = 1,21$ г/мл/ и повторно центрифугировали в течение 48 часов при 40000 об/мин и 4°С. ЛВП были диализованы с истощением против 5 мМ NH_4HCO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, рН 7,4, лиофилизированы и обезжирены при помощи смеси диэтиловый эфир/этанол /3: 1, объем/объем/. Концентрация белка была измерена либо аминокислотным анализом, либо методом Лоури и др. /Лоури О.Н., Розенбрух Н.Ж., Фарр А.Л., Рэндалл Р.Ж. Измерение белка с помощью фенольного реагента Фолина. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275/.

б). Выделение Аро АI-М/Аро АI-М.

Для выделения Аро АI-М/Аро АI-М аро-липопротеины ЛВП из примера 1а растворяли в 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащем 6 М Гуанидин-НСI /Гдн-НСI/. Аро-липопротеины наносили на колонку Сефакрил S-300 HR /2,6x300 см/, уравновешенную раствором 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащим 4 М Гдн-НСI, аро-липопротеины элюировали тем же буфером при объемной скорости потока 1,5 мл/мин; фракции по 10 мл собирали. Объединенные фракции, содержащие Аро АI-М/Аро АI-М, концентрировали под вакуумом и повторно наносили на ту же колонку. Фракции, содержащие чистый Аро АI-М/Аро АI-М, собирали, диализовали против 5 мМ NH_4HCO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, рН 7,4, лиофилизировали и хранили при -20°С в растворе 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащем 3 М Гдн-НСI. Препараты Аро АI-М/Аро АI-М имели чистоту 90%, как было показано высокоэффективной эксклюзионной хроматографией /ВЭЭХ/ и СДС-полиакриламидным гель-электрофорезом /СДС-ПАГЭ/ при невозобновляющих условиях. С использованием этого метода из плазмы носителей был выделен чистый димер Аро АI-V.

Пример 2. Очистка мономера из плазмы и после этого превращение его в димер.

а). Очистка Аро АI-М.

Для очистки мономера Аро АI-М аро-липопротеины ЛВП из примера 1а растворяли в 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащем 6 М Гдн-НСI и 1% 2-меркаптоэтанола. После 4 часов инкубации при 37°С восстановленный аро-ЛВП наносили на колонку Сефакрил S-200 /2,6x150 см/, уравновешенную 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащим 4 М Гдн-НСI и 0,1% 2-меркаптоэтанола. Аро-липопротеины элюировали тем же буфером при низкой объемной скорости потока 1,0 мл/мин; фракции по 5 мл собирали. Объединенные фракции, соответствующие аро АI+аро АI-М диализовали против 5 мМ NH_4HCO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, рН 7,4 и лиофилизировали. Аро-липопротеины растворяли в 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащем 6 М Гдн-НСI и 1% 2-меркаптоэтанола. После 4 часов инкубации при 25°С 2-меркаптоэтанол удаляли при помощи хроматографии на Сефадексе G25, а аро-липопротеины немедленно наносили на колонку тиопропил-сефароза /1x10 см/, уравновешенную 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащим 4 М Гдн-НСI. После повторного пропускания через колонку в течение ночи с низкой объемной скоростью потока /0,15 мл/мин/, нормальный Аро АI элюировали 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащим 4 М Гдн-НСI. Аро АI-М был затем элюирован тем же буфером, содержащим 4 М Гдн-НСI и 1% 2-меркаптоэтанола. Фракции, содержащие Аро АI-М, объединяли, диализовали против 5 мМ NH_4HCO_3 , 0,01% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, рН 7,4, лиофилизировали и хранили при -20°С в 0,1 М Трис-НСI, 0,04% $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$, 0,01% NaN_3 , рН 7,4, содержащем 3 М Гдн-НСI и 0,1% 2-меркаптоэтанола. Препараты АI-М имели чистоту > 98%, как было показано ВЭЭХ, СДС-ПАГЭ и изoeлектрической фокусировкой.

б). Синтез Аро АI-М/Аро АI-М.

Раствор Аро АI-М диализовали против 25 мМ буфера Трис-НСI, рН 9,0. Восстановленный Аро АI-М разводили до желаемой конечной концентрации /3,6-53,6 мкМ/ 25 мМ буфером Трис-НСI, содержащим восстановленный глутатион /ГСН/ /1-5 мМ/, и предварительно инкубировали при 25°С в течение 5 минут. Окисление начинали путем добавления окисленного глутатиона /ГССГ/ /0,1-10,0 мМ/ и проводили в плотно закрытых пробирках при той же температуре в течение 24 часов. За окислением следили при помощи СДС-ПАГЭ /смотри выше/. После окрашивания и промывания от излишков краски гели сканировали при помощи лазерного денситометра LKB Ultrosan XL и процентное распределение полос индивидуальных белков рассчитывали с использованием программного обеспечения LKB 2400 Gelscan XL. За кинетикой окисления следили с помощью ВЭЭХ.

Для того чтобы оптимизировать синтез димера, проводили дополнительные эксперименты по окислению в присутствии ГСН/ГССГ + Гдн-НСI и ГСН/ГССГ + тиоредоксин /Pigiet VP et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1986; 83: 7643-7647/.

Окисление Аро АI-М проводили в

закрытых пробирках в присутствии различных концентраций восстановленного/окисленного глутатиона /ГСН/ГССГ/. Выход димера в этой реакции зависел как от концентрации белка /фиг. 1, табл. 1/, так и от концентраций и соотношения ГСН/ГССГ /фиг. 2, табл. 1/. При увеличении концентрации белка с 8,9 мкМ до 53,6 мкМ процентный выход Аро AI-M/Аро AI-M увеличился с 26% до 51% /фиг. 1, табл. 1/. Уменьшение молярного соотношения ГСН/ГССГ с 1/2 до 1/16 привело к уменьшению на 43% выхода продукта; с другой стороны, повышение концентрации ГСН/ГССГ при постоянном молярном соотношении ГСН/ГССГ было связано с увеличением на 42% образования Аро AI-M/Аро AI-M /фиг. 2, табл. 1/. Ни температура реакции, ни присутствие денатурированного белка /Гдн-HCl/ не влияли на образования Аро AI-M/Аро AI-M. Значительное образование Аро AI-M/Аро AI-M также было достигнуто при инкубации Аро AI-M/ с ГСН/ГССГ в присутствии 0,2 мМ тиоредоксина /табл. 1/.

За кинетикой реакции окисления следили при помощи аналитической ВЭЭХ. Димерный и мономерный Аро AI-M давали отчетливые пики с временами задержки 10,8 и 12,7 минут, соответственно. Синтез AI-M/AI-M /ГСН/ГССГ 2 мМ/4 мМ, концентрация AI-M 8,9 мкМ/ почти завершился через 3 часа; продление инкубации до 24 часов не увеличило дальнейшего образования AI-M/AI-M /фиг. 3/.

Пример 3. Рекомбинантное образование Аро AI-M/Аро AI-M.

а). Конструкция экспрессионного вектора рКР644.

Репликативную форму бактериофага M13 mp18, содержащую кДНК, кодирующую аро-липопроутеин AI-M /Sharpe C.R. et al., Nucleic Acids Research, Vol, 12, N 9, p.3917, 1984 и Cheung M.C. et al., Biochem. Biophys Acta, 960, pp.73-82, 1988/, расщепляли рестрикционным ферментом BamHI и очищали гель-электрофорезом и использованием агарозы с низкой температурой гелеобразования /НТГ/. Фрагмент из 822 п.о., соответствующий гену Аро AI-M, вырезали и лигировали в плазмидой рUC9, которую предварительно расщепляли BamHI и обрабатывали кишечной фосфодиэстеразой теленка.

Лигированную смесь использовали для трансформации компонентных клеток E. coli JM83; белые колонии снимали с агаровых чашек, в которых содержались ампициллин, X-Гал и ИПТГ. Выделенную плазмидную ДНК очищали на колонках Quia Gene /Quia Gene Inc. 9259, Etonave., Chatsworth, Cal. 91311 USA/ в соответствии с рекомендациями производителя. Производная плаزمиды, названная рUA/Аро AI-M, расщеплялась EcoRI и NcoI. Одну часть расщепленной смеси анализировали с помощью агарозного электрофореза для подтверждения правильной ориентации. Другую часть использовали для лигирования с синтетическим линкером "ΔАро AI-Eco" /фиг. 4/ по 5'-концу гена Аро AI-M для того, чтобы получить ген ΔАроAI, состоящий из 724 п.о. Последовательность ΔАро AI-M образует сайт Asp-Pro на N-конце закодированного белка, что дает возможность расщепления муравьиной кислотой. Компонентные клетки E.coli M83 трансформировали лигированной

смесью, и производную ппзмиду /названную рUC/ ΔАро AI-M/ выделяли на колонках Quia Gene, как описано выше.

Плазмиду рUC/ΔАро AI-M и экспрессионный вектор рEZZ расщепляли EcoRI и BamHI, очищали электрофорезом с использованием агарозы НТГ, и фрагмент из 7999 п.о. рUC/ΔАро AI-M лигировали с фрагментом из 2763 п.о. оч. рEZZ. Лигированную смесь использовали для трансформации компетентных клеток E.coli RV 308; плазмидную ДНК получали, как описано выше.

Экспериментальные методики содержатся в Sambrook J., Fritsch. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning; A laboratory Manual 2nd edit. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Производная плазмиды была обозначена рКР644 /фиг. 5/.

б). Экспрессия слитого белка ZZ - ΔАро AI-M.

40 мл ночной культуры E.coli RV 308/рКР644, выращенной при 30° на среде LB с 50 мг/мл канамицина, высевали на минимальную среду A /Curr. Meth. in Mol. Biol./ /2x500 мл/ с добавлением 0,2 г/л казаминовых кислот, 1 мМ МоО₄, 0,25% глюкозы и 50 мг/мл канамицина. Культуру инкубировали при 37° в течение 24 часов при энергичном перемешивании.

с). Первичная очистка Аро AI-M.

30 1,0 л культуры E.coli /RV308/рКР644/, содержащей описанную плазмиду, центрифугировали, и осажденные клетки ресуспендировали в 30 мл 1xTS /25 мМ Трис-HCl, 0,2 М NaCl, 1 мМ ЭДТА/ и 6 М Гдн-HCl, а затем гомогенизировали путем однократного пропускания через французский пресс /SLM. Instruments Inc. /, с рабочим давлением 1000 ф/кв.д. Полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре с мягким перемешиванием в течение 1 часа и центрифугировали. Супернатант разводили затем до конечной концентрации Гдн-HCl 1 М /а именно, в 6 раз/ и наносили на колонку с 15 мл Сефарозы-ИгG с быстрым прохождением, уравновешенную 1xTS. После нанесения колонку промывали 5-ю колоночными объемами 1xTS, а затем 20 мМ раствором ацетата аммония с pH 5,4 до тех пор, пока pH элюата не достиг 5,4. Связанный материал элюировали 25 мл 0,2 М НАс, прослеживая поглощение при 280 нм /A₂₈₀/. Выход продукта с 1 л культуры на основании значений A₂₈₀ составил 1,9 г.

д). Расщепление слитого белка.

Элюат разделяли на равные части, лиофилизировали и ресуспендировали в 75%, 50% и 25% муравьиной кислоте, соответственно. Растворы инкубировали при 37°С в течение 28 часов и после этого лиофилизировали для удаления муравьиной кислоты. Продукт расщепления проанализировали с использованием СДС-ПАГЭ, сопровождавшимся Вестерн-анализом. Приблизительно 5 мг общего белка наносили на СДС-ПАГЭ с градиентом геля 8 - 25% в невосстанавливающих условиях. Образцы пропускали в двух повторностях. Один гель окрашивали Кумасси, а другой использовали для Вестерн-анализа. Результаты показаны на фиг. 6. Один из продуктов расщепления

движется с одинаковой скоростью с очищенным натуральным Aro AI и дает начало сигналам при Вестерн-анализе. Вестерн-анализ проводили с использованием поликлональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена /The Binding site Ltd, Cambridge, Engl./, при появлении использовали стандартные методики.

Фиг. 6 показывает анализ полученных белков после расщепления слитого белка. Плоскость геля А: гель СДС-ПАГЭ /8 - 25%, окрашенный Кумасси. Дорожка 1: 25% муравьиная кислота; дорожка 2: 50% муравьиная кислота; дорожка 3: 75% муравьиная кислота; дорожка 4: очищенный природный Aro AI /Sigma/ и дорожка 5: маркер LMW /Pharmacia/. Плоскость геля В: Вестерн-анализ второго экземпляра геля. Дорожка 1: очищенный природный Aro AI /Sigma/; дорожка 2: 75% муравьиная кислота; дорожка 3: 50% муравьиная кислота; дорожка 4: 25% муравьиная кислота. Присутствие полосы с удвоенным молекулярным весом Aro AI-M на Вестерн-анализе указывает на присутствие димера Aro AI-M.

Пример 4. Получение Aro AI-M в биореакторах.

Конструкция векторов для прямого выделения Aro AI-M в пориплазматическое пространство и среду для роста.

Штаммы и векторы. Штамм *Escherichia coli* K12, которые использовались в работе, имели следующие характеристики: HB101F⁻, hsd S20 (rB⁻, mB⁻) sup E44, HB101F⁻, hsd S20 (rB⁻, mB⁻), sup E44, ara 14, I⁻, gal K2, lac Y1, pro A2, rsp L20, xyl-5, mtl-1, rec A13, rB⁻, mB⁻, mcr A(+), mcr B(-) (Boyer et al., 1969, J. Mol. Biol. 41: 459 - 472), DH5a F⁻, F80 DlacZDM15, D(lacZYA-argF)U 169, rec A1, end AI, gyr A, I⁻, thi-I, hsd R17, (rK⁻, mK⁺), sup E44, rel AI, (BRL USA), RV308 Dlac X74, gal OP:: I S2 (gal IOP308), strA, I⁻ (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139: 147 - 161) и BC 50 xyl-7, ara-14, T4-R, I⁻.

Штаммы HB101 и DH5a использовали для субклонирования фрагментов ДНК. Плаزمиды pUC9 /Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259 - 68/ использовались для субклонирования BamHI-фрагмента в 821 п.о. копии кДНК человеческого Aro AI, полученной от S. Sidoni (Milano). Нуклеотидная последовательность кДНК человеческого Aro AI может быть получена из Банка Генов под каталожным номером XO2162 /Seilhammer et al., 1984, DNA 3: 309 - 317/. Этот вектор был обозначен рКР575. На плазмиде pUC9 также был субклонирован EcoRI-Pst 1-фрагмент в 865 п. о. ДНК человеческого Aro AI-M /копия кДНК получена от S. Sidoni/. Это производное было обозначено рКР576. Плазмиды рКР683 и рКР764 являются производными плазмид рTR с 99 /Amann et al., 1988, Gene, 69: 301-15/ и производного pUC с маркером устойчивости к канамицину, произошедшему от транспозона /Tn903/ из pUC4-K /Vieira et al., 1982, Gene, 19: 259 - 268 и Oka et al., 1981, J. Mol. Biol., 147:217/ и терминаторами транскрипции /T1T2/ бактериофага fd из pUEx2 /Bressan et al., 1987, Nucleic Acid Res. 15: 10056/.

Использованные методы. Бактериальные штаммы выращивали на среде Лурия Бертани /LB/ или на среде с дрожжевым экстрактом и триптоном -2хYT/ с добавлением

ампициллина /Ap/ 50 мкг/мл или канамицина /Km/ 70 мкг/мл для получения плазмидной ДНК и для анализа экспрессии в небольшом масштабе /Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press/. Щелочной триптозный кровяной агар /Difco, USA/, дополненный Ap 50 мкг/мл или Km 70 мкг/мл, использовали для выращивания клеток на агаровых чашках. Технику работы с рекомбинантной ДНК выполняли в соответствии с Sambrook et al., 1989 /Cold Spring Harbor Laboratory Press/. Рестрикционные эндонуклеазы и ДНК-лигаза T4 были получены от фирмы Boehringer Mannheim (Germany), фирмы New England Biolab (Beverly, USA) или фирмы Pharmacia (Uppsala, Sweden). Изопропил-b-D-галактозид /ИПТГ/ был получен от фирмы Sigma (USA). Агароза с низкой температурой плавления и гелеобразования /Nu Sieve GTG, FMC Bioproducts, USA/ использовалась для выделения фрагментов ДНК, ПЦР-амплификации были выполнены с использованием прибора с циклическим изменением температурного режима для ДНК и ДНК-полимеразы Tag от фирмы Perkin-Elmer (Cetus Instruments/Norwalk, USA). Олигонуклеотидные линкеры и праймеры были синтезированы на приборе Pharmacia-LKB Gene Assembler Plus от фирмы Pharmacia (Uppsala, Sweden/ с использованием фосфиттриэфирного метода на твердой фазе. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе Applied Biosystem 373A DNA sequencer с использованием набора Tag Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing от фирмы Applied Biosystem (USA).

Компьютерные программы, использованные при работе в ДНК. Для составления плазмидных карт использовали программу Macintosh Plasmid ARTIST /версия 1, 2/ /Clontech, USA/, а для определения последовательности ДНК использовали пакет программ по анализу ГСГ/последовательностей /Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wisconsin, USA). на цифровом компьютере VAX. Конструкция, экспрессия и выделение Aro AI-M из бактерий.

Целью конструирования вектора было получение системы образования и выделения Aro AI-M в *E. coli* с очень высоким уровнем Aro AI-M, выделяемого в среду для роста. Были синтезированы два олигонуклеотида для слияния кДНК Aro AI и Aro AI-M с фрагментами ДНК, кодирующими последовательности бактериальных сигналов. EcoRI-NcoI-фрагмент в 14 п.о. и NcoI-фрагмент в 40 п.о. плазмиды рКР575 был замещен синтетическим EcoRI-NcoI-фрагментом в 37 п.о. в плазмиде, обозначенной рКР580. Сайт расщепления BbsI на синтетическом фрагменте ДНК образует сайт расщепления, подобный сайту MluI, что дает возможность клонировать различные фрагменты, кодирующие последовательности бактериальных сигналов. Плазмиды рКР631 была сконструирована путем замещения NcoI-DraIII-фрагмента в 702 п. о. плазмиды рКР575 /Aro AI/ NcoI-DraIII-фрагмента в 702 п.о. плазмиды рКР576 /Aro AI-M/. Из плазмиды рКР631 BbsI-HindIII-фрагмент в 820 п.о. был выделен и вставлен в сайты MluI и HindIII

плазмидного вектора, который обозначили рКР682. Этот вектор содержит промотор *tac* /*Ptac*/, производное сигнальной последовательности *ompA*, два терминатора транскрипции и маркер устойчивости к канамицину. П I-П I-фрагмент в 1501 п. о. был выделен из плазмиды рКР682 и вставлен в подобный вектор, но *Ptac* был заменен промотором *P_{trc}*. Экспрессионный вектор был обозначен рКР683. Плазмида рКР764 была сконструирована путем замещения *Dralll-HinsIII*-фрагмента в 88 п.о. плазмиды рКР683 на синтетический фрагмент ДНК в 14 п. о., содержащий более сильные терминаторы трансляции и разрушенный сайт *Dralll* /разрушенный при помощи ввода A в конец выступающего 3'-конца *Dralll*/. Трансформацию штаммов *E.coli* выполняли как описано в Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Плазмидные конструкции, использованные в экспериментах по экспрессии и для образования Аро AI-M, были проанализированы с использованием картирования рестрикционными ферментами, а структурные гены Аро AI-M проверяли определением нуклеотидной последовательности. Штаммы *E. coli* с подходящими плазмидами, которые использовали для выращивания в биореакторах, получали следующим образом. Клетки выращивали в течение ночи на среде LB или 2 x YT, дополненной Km, в качалочных колбах при 30°C. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 1/2 объеме среды, хранящейся в условиях глубокого холода, в соответствии с Gergen et al., 1979. Nucleic Acid Res 7: 2115. Равные части разливали по специальным 1 мл-флаконам для хранения при низких температурах и до использования хранили при -75°C.

Питательные среды для клеток, выращиваемых в биореакторах.

Среда А: 16 г/л триптона /Difco, USA/, 8 г/л дрожжевого экстракта /Difco, USA/, 5 г/л NaCl и 0,05 г/л канамицина. Среда В: 2,5 г/л /NH₄/₂SO₄, 3 г/л K₂HPO₄, 0,5 г/л Na₃-цитрата, 5 г/л дрожжевого экстракта /Difco, USA/. После стерилизации среда дополнялась 10 г/л исходной глюкозы, 0,05 г/л канамицина, 1 г/л MgSO₄ • 7H₂O и 0,07 г/л тиамингидрохлорида. Добавляли также раствор микроэлементов /1 мл/л/ и раствор витаминов /0,65 мл/л/. Раствор микроэлементов содержал: 27 г/л FeCl₃ • 6H₂O, 4 г/л ZnSO₄ • 7H₂O, 7 г/л CoCl₂ • 6H₂O, 7 г/л Na₂MoO₄ • 2H₂O, 8 г/л CuSO₄ • 5H₂O, 2 г/л H₃BO₃, 5 г/л MnSO₄ • 4H₂O, 11 г/л CaCl₂ • 2H₂O и 50 мл/л HCl. Раствор витаминов содержал: 0,5 г/л пантотената кальция, 0,5 г/л холин-хлорида, 0,5 г/л фолиевой кислоты, 1 г/л инозита, 0,5 г/л никотинамида, 0,5 г/л пиридоксин-гидрохлорида, 0,05 г/л рибофлавина и 0,5 г/л тиамингидрохлорида. В качестве пеногасителя использовался адекватанол /0,2 мл/л/. В случае необходимости в течение культивирования делали дальнейшие добавки пеногасителя.

Культивирование RV308/рКР683 в биореакторе на 3,5 литра. В качестве посевного материала использовали культуру, хранящуюся в условиях глубокого холода; этой культурой засеивали 500 мл среды А и

сначала культивировали в колбах Эрленмейера объемом 2 л с отбойниками при 30°C в течение 8 - 10 часов. Объем посевного материала, соответствующий 10% от рабочего объема биореактора, переносили в биореактор. Культивирование проводили в биореакторе на 3,5 литра /Belach AB, Sweden/ с рабочим объемом 2,5 л. В течение фазы роста до индукции синтеза белка температура была 30°C, а затем повышалась до 37°C, pH поддерживался на уровне 7,0 с помощью 25% раствора аммиака. Интенсивность аэрации поддерживалась на уровне 1 оом, а давление растворенного кислорода /ДРК/ поддерживалось на уровне 30% при помощи регулирования скорости мешалки. После того как была израсходована начальная глюкоза, стали подавать подпитывающий раствор глюкозы, поддерживая в системе ограничение по глюкозе путем подпитывания 60%-ным раствором глюкозы. Начальная скорость подпитки, 0,04 г/мин, сохранялась в течение 3 часов, а затем постепенно повышалась до 0,4 г/мин в течение 3-х часов. За ростом клеток наблюдали по изменению оптической плотности /ОП/. Концентрацию Аро AI-M в надосадочной жидкости определяли при помощи радиоиммуноанализа /набор Apolipoprotein AI RTA 100, art. no. 109152-01, Kabi Pharmacia, Sweden/. После 16 часов культивирования, когда ОП составляла 58, индуцировали синтез белка путем добавления 0,5 мМ ИПТГ, а температуру увеличивали до 37°C. Через 4 часа после индукции концентрация Аро AI-M составляла 2,3 г/л, а через два дополнительных часа была 2,5 г/л.

Культивирование BC50/рКР764 в биореакторе на 3,5 л.

Культивирование выполняли, как описано выше, за исключением того, что к среде в биореакторе не добавляли канамицин. Через 15 часов, когда ОП составляла 60, добавляли ИПТГ и повышали температуру. Через 10 часов концентрация Аро AI-M в надосадочной жидкости составляла 3,7 г/л, а через 22 часа после индукции концентрация составляла 4,4 г/л.

Культивирование BC50/рКР764 в биореакторе на 300 литров.

Использовали биореактор на 300 литров /Chemoferm AB, Sweden/ с рабочим объемом в 180 литров. Посевной материал готовили, как описано выше для выращивания RV308/рКР683 в биореакторе на 3,5 литра, за исключением того, что время предварительного культивирования в качалочных колбах было 14 часов. Посевной материал переносили в биореактор для выращивания посевного материала на 50 литров с рабочим объемом 18 литров. Средой, которая использовалась в качалочных колбах, так же как и в биореакторе, была среда А. Среда в посевном биореакторе была дополнена 5 г/л глюкозы, а температура была 30°C, pH и аэрация были такими же, как описано выше для выращивания RV308/рКР683 в биореакторе на 3,5 литра, а ОП никогда не превышала 30%. Когда ОП культуры достигла 4, содержимое посевного биореактора было перенесено в биореактор на 300 литров. В этом биореакторе температура, pH и аэрация среды были такими же, как описаны выше для выращивания RV308/рКР683 в биореакторе

на 3,5 литра. Перед индукцией ДРК поддерживали на уровне 30% или несколько выше при помощи увеличения скорости мешалки до ее максимального значения, а затем увеличивали давление воздуха. После индукции давление воздуха было увеличено до 2 бар, что привело к изменению ДРК на 15 - 20%. Через 16 часов культивирования в биореакторе, когда ОП культуры составляла 51, добавляли ИПТГ и повышали температуру до 37°C. Концентрация Аро АI-M, как мономера и как димера, составляла 1,3 г/л; через 5 часов после индукции и в течение следующего часа, в то время как охлаждался биореактор, концентрация Аро АI-M увеличилась до 1,5 г/л.

Все количество присутствующего мономера было превращено в димер и очищено в соответствии с традиционными методами.

Пример 5. Характеристика Аро АI-M/Аро АI-M из плазмы.

Очищенный Аро АI-M/Аро АI-M из примера 1 после прохождения через СДС-ПАГЭ в невосстанавливающих условиях дает одну полосу. В аналитическом СДС-ПАГЭ очевидный молекулярный вес белка составил, как и ожидалось, 56 кД, Аро АI-M/Аро АI-M показал сложный изоморфный образец, характеризующийся присутствием по крайней мере 6 различных белковых полос в диапазоне 5,3 - 5,6 ИЭТ в невосстанавливающих, денатурированных гелях для ИЭФ.

Спектр УФ Аро АI-M/Аро АI-M /1,1 мг/мл показал типичный максимум поглощения при 280 нм с плечом на 290,2 нм /фиг. 7/. Е расчетного белка /1 см, 1%/ при 280 нм составлял 16,9. Для оценки обнажения тирозиновых остатков в молекуле Аро АI-M/Аро АI-M выполняли анализ второй производной УФ-спектра, как описано у Рагона Р. и др. "Определение обнажения тирозина в белках спектроскопией второй производной" /Biochemistry, 1984; 23: 1871 - 1875/. 2 УФ-спектр второй производной в типичном случае показывает два минимума, сосредоточенных вокруг 283 и 290,5 нм, и два максимума около 287 и 295 нм /фиг. 8 - 10/. Относительные степени обнажения тирозина /альфа/, рассчитанные для натурального Аро АI-M/Аро АI-M и Аро АI-M/Аро АI-M + ДМФХ были 0,75 и 0,49 соответственно /табл. 2/.

Были зарегистрированы спектры флуоресценции Аро АI-M/Аро АI-M /0,1 мг/мл/ и в возбужденном состоянии и во время эмиссии. Максимальная длина волны при возбуждении остатков триптофана в Аро АI-M/Аро АI-M составляла 280 нм, и не изменялась вследствие соединения с ДМФХ. Спектр эмиссии /возбуждение при 280 нм/ показал максимальную длину волны 344 нм /фиг. 11/; соединение с ДМФХ вызвало сдвиг этого максимума в "голубую" сторону /338 нм/ в связи с увеличением на 24% интенсивности флуоресценции в этом максимуме /фиг. 11/.

Спектр КД в дальней УФ-области Аро АI-M/Аро АI-M характеризуется типичными минимумами при 208 нм и 22 нм и максимумами около 195 нм /фиг. 12/. Содержание альфа-спиралей значительно увеличивалось с увеличением концентрации белка от 0,1 мг/мл до 1,1 мг/мл /фиг. 12, табл. 2/. Соединение Аро АI-M/Аро АI-M /0,1 мг/мл/ с ДМФХ вызвало дальнейшее

увеличение альфа-спиральной структуры белка /фиг. 2, табл. 2/.

Методы характеристики продукта.

Инкубация с фосфолипидами.

Взвешенные количества

5 димиристоилфосфатилхолина /ДМФХ/ растворяли в этаноле и выпаривали растворитель под N₂; какие-либо остатки растворителя были удалены под вакуумом в течение 2 часов. Суспензию ДМФХ в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7,4, смешивали с Аро АI-M/Аро АI-M /конечная концентрация 0,1 мг/мл/ в молярном соотношении ДМФХ /Аро АI-M/Аро АI-M 100:1.

Спектроскопия.

15 Растворы Аро АI-M/Аро АI-M диализовали против 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, и разводили тем же буфером до желаемой концентрации белка.

20 УФ-спектры /нормальные и вторых производных/ растворов Аро АI-M/Аро АI-M и Аро АI-M/Аро АI-M 1 ДМФХ регистрировали на спектрометрах Jasco Uvides-610 и Perkin Elmer Lambda-2 при 25°C с использованием кварцевых кювет 1 см.

25 Топографическое расположение остатков тирозина было исследовано в соответствии с уравнением Рагона и др. /РAGON P., Колонна Ж., Балестриери С., Сервилло Л., Ираке Ж. Определение обнажения тирозина в белках спектроскопией второй производной. Biochemistry, 1984; 23: 1871 - 1875/.

$$\text{Альфа} = (r_n - r_a) / (r_u - r_a),$$

30 где альфа является степенью обнажения тирозина в растворителе, r_n и r_u являются отношениями пиков производных /a/v/ для натурального и развернутого /в 6 М Гдн-НСI/ Аро АI-M/Аро АI-M соответственно, а r_a является отношением пика второй производной раствора, содержащего свободные тирозин и триптофан, смешанные в таком же молярном соотношении, каким оно является в молекуле Аро АI-M/Аро АI-M.

35 Флуоресцентные спектры, присущие растворам Аро АI-M/Аро АI-M и Аро АI-M/Аро АI-M + ДМФХ, регистрировали на спектрофлуориметре Jasco FP-550 при 25°C.

40 Спектры кругового дихроизма /КД/ растворов Аро АI-M/Аро АI-M и Аро АI-M/Аро АI-M + ДМФХ регистрировали на спектрополяриметре Jasco J 500A при 25°C.

45 Значения величин эллиптичности остатка [ТНЕУА] выражали в градусах • см² • дмоль⁻¹ и рассчитывали по уравнению

$$[TNEUA] = \frac{[TNEUA]_{106}}{10 \times l \times c}$$

50 где [ТНЕУА] является наблюдаемой эллиптичностью в градусах: 106 обозначает молекулярный вес остатка белка, 1 является длиной пробега в см, а с является концентрацией белка в г/мл.

55 Процент альфа-спиралей рассчитывался с использованием уравнения

$$* \text{альфа-спиралей} = \frac{[TNEUA]_{280 \text{ нм}} - 4,000}{33,000 - 4,000}$$

60 /Гринфилд Н., Фасман Ж.Д. Расчет спектров кругового дихроизма для оценки конформации белка. Biochemistry, 1969; 8: 4108 - 4116/.

Электрофорез.

Аналитическую изоэлектрическую

фокусировку с СДС-ПАГЭ выполняли как описано предварительно /Францесчини Ж., Сиртори М., Жанфранцесчи Ж., Сиртори Ц. Р. Отношения между аро-протеинами ЛВП и изопротеинами А1 у организмов с признаком А1-М. *Metabolism*, 1981; 30: 502 - 509/.

Изоэлектрическую фокусировку выполняли в 10% акриламидных гелях, содержащих 6 М мочевины и 4% амфолинов /рН 4 - 6/. После фокусировки в течение ночи гели фиксировали и окрашивали красителем Кумасси бриллиантовой голубой Р-250, растворенным в смеси уксусная кислота/изопропиловый спирт. Изоэлектрические точки /ИЭТ/ полос любых неизвестных белков рассчитывали при построении графика ИЭТ известных белков /стандарты от фирмы Bio-Pad и аро-ЛВП/ против соответствующих расстояний перемещения.

Для СДС-ПАГЭ использовали 14% акриламидные гели, содержащие 0,1% СДС. Гели обрабатывали, как описано: молекулярный вес неизвестных белков вычисляли по графику $\log MW$ стандартных белков /KAB1-Pharmacia/ против расстояний перемещения.

Высокоэффективная эксклюзионная хроматография.

Аналитические разделения ВЭЭХ выполняли с использованием жидкостного хроматографа Jasco, снабженного колонкой 10 мкм TSK-G3000SW /7,5 x 300 мм/. Колонка ВЭЭХ была уравновешена и элюировалась 0,1 М фосфатным буфером, 0,1 М NaCl, рН 7,2, содержащим 8 М мочевины. Белки элюировали при объемной скорости потока 0,5 мл/мин, считывание показаний прибора производилось при 220 нм. Площадь пиков определяли с использованием интегратора HP-3390.

Пример 6. Производство частиц рДВП, содержащих Аро А1, Аро А1-М или Аро А1-М/Аро А1-М.

Вновь составленные частицы липопротеинов с высокой плотностью /рЛВП/ были получены с использованием методики, представленной Nichols A.V. et al. *Biochim. Biophys. Acta.*, 750: 353 - 364 /1983/ и Matz C.E. et al., *J. Biol. Chem.* 257: 4535 - 4541 /1982/.

Димер рекомбинантного Аро А1-М /из примера 4/ и нормальный Аро А1, очищенный из человеческой плазмы, растворяли в 10 мМ Трис-НСl, 0,15 М NaCl, 0,01% ЭДТА, 0,006 NaN_3 , рН 8,0 /буфер А/, содержащем 4 М Гдн-НСl в концентрации 6 мг/мл. Для сравнения, дисульфидные связи в некоторой части Аро А1-М/Аро А1-М восстанавливали добавлением 20 мМ ДТГ к буферу А + Гдн-НСl. Белки подвергали глубокому диализу против буфера А и разводили этим же буфером до концентрации 5,2 мг/мл.

Фосфолипиды - либо яичный фосфатидилхолин /ЯФХ/, либо пальмитоилолеилфосфатидилхолин /ПОФХ/ - растворяли в $CHCl_3$, высушивали по N_2 и хранили под вакуумом в течение ночи. Добавляли хелат натрия в соотношении хелат/ФХ 0,55 /в/в/, смесь энергично перемешивали в течение 3 минут при комнатной температуре и инкубировали при 4°C в течение 2 часов. Затем добавляли белок в весовом соотношении ФХ/белок 2,17 /для ПОФХ/ или 2,47 /для ЯФХ/, смесь

перемешивали в течение 3 минут при комнатной температуре и инкубировали при 4°C в течение ночи. После диализа против буфера А в течение 5 дней смесь центрифугировали при 11000 об/мин в течение 5 минут на микроцентрифуге Beckman и собирали надосадочную жидкость.

рЛВП отделяли при помощи неденатурирующего полиакриламидного градиентного гель-электрофореза /ГГЭ/, размер частиц определяли, как предварительно описано Nichols A.V. et al., *Meth. Enzymol.* 128: 417 - 431 /1986/.

Все проверенные аро-липопротеины после описанной процедуры почти полностью соединились с липидами, что явствует из весьма незначительных пиков безлипидных аро-липопротеинов на гелях ГГЭ. Включение белка в рЛВП колебалось между 68% и 100% в 10 различных препаратах.

Профили ГГЭ вновь составленных частиц ЛВП показаны на фиг. 13. ЛВП, составленные из Аро А1 и ЯФХ, дают основной пик на ГГЭ с диаметром 9,6 нм; также были обнаружены второстепенные компоненты как большего, так и меньшего размера. рЛВП, содержащие ЯФХ и Аро А1-М/Аро А1-М, состоят из двух основных /диаметры: 8,6 и 12,9 нм/ и двух второстепенных /диаметры: 7,9 и 10,8 нм/ компонентов /фиг. 13/; тот же самый размер частиц был получен, когда Аро А1-М/Аро А1-М включался в частицы вместе с ПОФХ.

Все три аро-липопротеина были почти полностью включены в стабильные липидно-белковые комплексы с различным размером частиц рЛВП, распределением и составом. В частности, рЛВП, сделанные из рекомбинантного Аро А1-М/Аро А1-М, состоят из двух основных компонентов, больший из которых является уникальным среди семейства Аро А1-М, содержащих рЛВП.

Биологическая оценка Аро А1-М/Аро А1-М.

Пример 7. Кинетическое поведение димера Аро А1-М в сравнении с мономером Аро А1-М у нормальных реципиентов.

Димеры продемонстрировали продленное присутствие в кровеносной системе, что было показано в исследованиях кинетически у человека, представленных ниже.

Здоровые добровольцы получали внутривенно ^{125}I -меченый Аро А1-М или Аро А1-М/Аро А1-М. В табл. 3 показано время полураспада в плазме βt 1/2 /4/, вычисленное в соответствии с двумя различными моделями, а также скорость дробленного разложения /СДР/. Оба показателя подтверждают заметно сниженный катаболизм димера по сравнению с мономером. Очень медленный катаболизм Аро А1-М/Аро А1-М указывает на то, что эти молекулы могут снижать превращение липопротеинов и, возможно, действовать в качестве эффективного предшественника Аро А1-М. Таким образом, после инъекции Аро А1-М/Аро А1-М можно предвидеть, что димер сможет оставаться в плазме в течение продолжительного периода времени и, следовательно, прямо воздействовать на метаболизм липопротеинов и на систему разрушения фибрина.

Влияние Аро А1-М/Аро А1-М на систему разрушения фибрина.

Вступление.

Система разрушения фибрина является главной защитой от фибриновых отложений

на стенках сосудов и в этом качестве играет важную роль среди механизмов, которые предотвращают тромбоз.

Ферментом, ответственным за разрушение фибрина, является плазмин. Плазмин образуется из неактивного предшественника - плазминогена - под действием специфических активаторов /тканевый активатор плазминогена, ТАП, и урокиназа, УАП/. И процесс активации, и действие плазмину регулируются специфическими ингибиторами - ингибитор активатора плазминогена 1 /ИАП/ и альфа-2-антиплазмин соответственно. Схема фибриноразрушительной системы

Активаторы плазминогена



ДФФ = продукт деградации фибрина.

Целью настоящего исследования в примерах 7 - 9 было установить, как димер Аро АI-M действует на человеческую фибрино-разрушительную систему. И самоактивация плазминогена, и его активация ТАП и УАП были изучены в присутствии и в отсутствие Аро АI-M/Аро АI-M. Человеческий Аро АI, выделенный из плазмы, использовался в качестве контроля /продукт фирмы Sigma, N = A 9284/.

Активация фибриноразрушающей системы измерялась при помощи хромогенных субстратов. Эти субстраты содержат хромофорную группу паранитроанилина, который может отщепляться от молекулы субстрата под действием плазмину. Свободный п-НА имеет яркую желтую окраску, за которой можно легко следить при длине волны 405 нм. Количество п-НА, которое освобождается, прямо пропорционально количеству образовавшейся ферментной активности. Все измерения были сделаны с использованием устройства для считывания результатов с микрочашек THERMO max, управляемого программой SOFTmax™, версия 2.01, из приборного обеспечения работ на молекулярном уровне /Menlo Park, CA., USA/. Серии образцов, использованные в этих исследованиях, были получены рекомбинантным способом в соответствии с примером 4. Очистка включала все традиционные биохимические методы: ионообменную хроматографию, хроматографию с использованием гидрофобного взаимодействия и гель-фильтрационную хроматографию, сопровождающуюся ультрафильтрацией и высушиванием из замороженного состояния. Все исследованные серии образцов содержали 90% димерной формы, что было показано обратнотазовой ВЭЖХ. Концентрацию определяли с использованием Kabi Pharmacia aroplipoprotein AIRIA-100.

Были исследованы три препарата - А, В и С.

Пример 8. Самоактивация плазминогена в присутствии Аро АI-M/Аро АI-M и Аро АI.

Глу-плазминоген /конечная концентрация 94 мкг/мл/ инкубировали в течение трех часов при 37°C в 0,1 моль/л Трис-буфере, рН 7,6.

За образованием плазмину следили с помощью хромогенного субстрата S-2251 /H-DVal-L-Leu-L-Lys-pNA/, полученного от фирмы Chromogenix AB, Molndal, Sweden. Он был в конечной концентрации 0,6 ммоль/л. Плазминогены, использованные в этом исследовании, были получены от фирмы Chromogenix AB или от фирмы IMCO Inc. Stockholm, Sweden.

В этом исследовании были проверены серии образцов Аро АI-M/Аро АI-M /конечная концентрация 3,9 - 75 мкг/мл/, количество плазмину, образующееся в их присутствии, сравнивали с количеством плазмину, образующегося в присутствии Аро АI /конечная концентрация 125 мкг/мл/, и с количеством плазмину, образующегося в отсутствие каких-либо добавок /контроль/ /табл. 4/.

Неожиданно было обнаружено, что Аро АI-M/Аро АI-M может повышать активацию плазминогена в отсутствие каких-либо активаторов плазминогена. Аро АI, произошедший из плазмы, никаким образом не влиял на молекулу плазминогена.

Наблюдаемая активность может быть приписана Аро АI-M/Аро АI-M. Однако на основании этих данных нельзя исключить, что Аро АI-M/Аро АI-M был загрязнен каким-то протеолитическим ферментом(ами), который может активировать плазминоген. Были выполнены эксперименты для того, чтобы исключить такую возможность.

Все препараты Аро АI-M/Аро АI-M, использованные в фибриноразрушающих анализах, были проверены с хромогенными субстратами S-2251

/H-D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA/, чувствительному к плазминоподобной активности, и S-2288 /H-D-Ile-Pro-Arg-pNA/, чувствительному к Arg-специфичным протеазам. Субстраты были получены от фирмы Chromogenix AB. Конечная концентрация Аро АI-M/Аро АI-M в этих анализах была одинаковой с концентрацией, использованной в фибриноразрушающих экспериментах и, таким образом, могла колебаться между различными сериями образцов.

Анализ: 25 мкл Аро АI-M/Аро АI-M /конечная концентрация 60 - 70 мкг/мл/, 150 мкл 0,1 моль/л Трис-буфера, рН 7,8, 50 мкл S-2251 /0,6 ммоль/л/ или S-2288 /1,0 ммоль/л/.

Образец, содержащий только буфер и субстрат, использовали в качестве контроля неспецифического гидролиза субстрата. Все образцы были проанализированы в двух повторностях.

Чашки для микротитрования инкубировали при 37°C и показатели поглощения регистрировали с часовыми интервалами.

В другой серии экспериментов Аро АI-M/Аро АI-M обрабатывали необратимым ингибитором сериновых протеаз - диизопропил -фторфосфатом, ДФФ /продукт фирмы Sigma, N = D0789/. Конечная концентрация Аро АI-M/Аро АI-M в буфере 0,2 моль/л KHCO₃, рН 7,6, составляла, приблизительно, 75 мкг/мл. ДФФ, конечная концентрация 123 ммоль/л, добавляли к этому раствору. Через 4 часа инкубации образцы диализовали в течение ночи против двух смен карбонатного буфера.

Определение активности с использованием тех же условий, которые описаны раньше, выполняли с Аро АI-M/Аро

AI-M, обработанным ДФФ, и с необработанным Aro AI-M/Aro AI-M. Через 3 часа инкубации с плазминогеном и S-2251, ОП при 405 нм составляла 0,209 для образцов, содержащих Aro AI-M/Aro AI-M, обработанный ДФФ, 0,234 для образцов, содержащих необработанный Aro AI-M/Aro AI-M, и 0,030 для образцов, содержащих только плазминоген.

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемый эффект активации плазминогена прямо связан с присутствием Aro AI-M/Aro AI-M, а не вызван какими-либо возможными протеолитическими загрязнителями.

Пример 9. Действие Aro AI-M/Aro AI-M на активацию плазминогена в присутствии активаторов плазминогена ТАП и УАП.

И урокиназа /УАП/, и тканевый активатор плазминогена /ТАП/ превращают плазминоген в плазмин путем протеолитического расщепления одной пептидной связи - Arg 560-Val 561 в молекуле плазминогена. В то время как двухцепочечная урокиназа может прямо активировать плазминоген, ТАП требует присутствия фибрина для своей оптимальной активации плазминогена. Присутствие каталитических количеств фибрина, который вместе с ТАП и плазминогеном образует тройной комплекс, будет повышать ферментную эффективность ТАП приблизительно в 600 раз.

Активацию плазминогена с участием ТАП изучали при помощи выпускаемого промышленностью набора Spectrolyse^R /фибрин/ ТАП/ИАП от фирмы Biopool AB, Umea, Sweden.

В этом анализе плазминоген инкубировали с ТАП в присутствии хромогенного субстрата D-But-СНТ-Lys-пНА и дезАА-фибриногена /мономер фибрина/, который действует как стимулятор активации. Облучающийся плазмин расщепляет субстрат с образованием свободного пНА.

Aro-AI-M/Aro-AI-M добавляли к этой системе и сравнивали с препаратом Aro AI от фирмы Sigma. Действие обоих аро-липопротеинов проверяли в этой системе как в присутствии, так и в отсутствие фибрина.

Пример анализирующей системы:

25 мкл буфера Spectrolyse,
25 мкл препарата Aro или буфера 20 мкл ТАП /конечная концентрация = 1,7 МЕ/мл/,
150 мкл реагента Spectrolyse PAR /=смесь плазминогена и субстрата/,
10 мкл Desa fib /=мономер фибрина/ или 10 мкл буфера.

Образцы инкубировали в чашках для микротитрования при 37 °С в течение трех часов.

Значительная стимуляция активации плазминогена наблюдалась при действии Aro AI-M/Aro AI-M как в присутствии, так и в отсутствие фибрина. Aro AI стимулировал активацию в меньшей степени в присутствии фибрина. В отсутствие фибрина стимуляция при действии Aro AI-M/Aro AI-M была очень резко выраженной в сравнении с очень низкой стимуляцией при действии Aro AI.

Aro AI-M/Aro AI-M также показал значительный усиливающий эффект, когда плазминоген активировали при помощи УАП. Урокиназа, использованная в этом анализе, представляла собой препарат с высоким

молекулярным весом, полученный от фирмы Calbiochem.

Урокиназу /конечная концентрация 2,5 МЕ/мл/ смешивали с плазминогеном /конечная концентрация 94 мкг/мл/ и хромогенным субстратом S-2251 /конечная концентрация 0,6 ммоль/л/. К этой смеси добавляли образец Aro AI-M/Aro AI-M в конечной концентрации 75 или 62 мкг/мл. Реакцию проводили в 0,1 моль/л Трис-буфере, pH 7,6.

Подобно ТАП, наблюдалась сильная стимуляция образования плазмина при участии УАП, когда к анализирующей смеси добавляли APO AI-M/Aro AI-M /табл. 7/.

Усиливающее действие на разрушение фибрина также сохраняется, когда Aro AI-M/Aro AI-M приготовлен в виде фармацевтического состава вместе с носителем. В качестве возможного носителя применялись липосомы, состоящие из фосфатидилхолина, ФХ /12 мг/мл/. Концентрация Aro AI-M/Aro AI-M /серия образцов С/ в липосомах была 3,6 мг/мл.

Активацию плазминогена /конечная концентрация 94 мкг/мл/ с участием УАП /конечная концентрация 2,5 МЕ/мл/ проверяли в присутствии липосом, заполненных Aro AI-M/Aro AI-M, и сравнивали с активацией, осуществляющейся в присутствии липосом, не содержащих белка. Образцы инкубировали в течение четырех часов при 37°С с S-2251; за образованием плазмина непрерывно следили.

Активация плазминогена с участием УАП. Действие APO AI-M/Aro AI-M /серия образцов С/ в липосомах. Результаты выражены в виде ОП при 405 нм.

Образец - ОП при 405 нм
УАП + плазминоген + липосомы, не содержащие белка - 0,221
250 мкг/мл ФХ + Aro AI-M/Aro AI-M, 75 мкг/мл - 0,499
в липосомах; 250 мкг/мл ФХ - 1,084

Присутствие пустых липосом стимулирует активацию плазминогена приблизительно в 2 раза. Добавление Aro AI-M/Aro AI-M в липосомы увеличивает этот эффект в пять раз - в сравнении с образцом, содержащим только урокиназный активатор.

Пример 10. Действие Aro AI-M/Aro AI-M на превращение одноцепочечной урокиназы в двухцепочечную урокиназу.

Одноцепочечная урокиназа /ОЦ-УАП/ является предшественником двухцепочечной урокиназы /УАП/. В отличие от УАП ОЦ-УАП обладает только очень низкой активностью, разрушающей амидную связь, в отношении небольших синтетических субстратов. Активность, разрушающая амидную связь, составляет самое большее 0,4% от активности УАП. Однако несмотря на то что ОЦ-УАП является про-ферментом, она обладает способностью активировать плазминоген в плазмин. Предполагается, что в смеси плазминогена и ОЦ-УАП в активацию плазминогена в плазмин вовлечена последовательность из трех реакций:

1) ОЦ-УАП + плазминоген ----> ОЦ-УАП + плазмин
2) плазмин + ОЦ-УАП ----> плазмин + УАП
3) УАП + плазминоген ----> УАП + плазмин

Мы изучили последовательность реакций, приводящих к превращению ОЦ-УАП в УАП в присутствии плазминогена. Урокиназную

активность обнаруживали с помощью урокиназно-специфического хромогенного субстрата S-2444 /пиро-Glu-Gly-Arg-pHA/ от фирмы Chromogenix AB. Серийные образцы Aro AI-M/Aro AI-M и Aro AI добавляли к системе, и величину образовавшейся активности УАП сравнивали с активностью, полученной в образцах без добавления аро-липопротеина. Однопочечная урокиназа, использованная в этих анализах, была рекомбинантным продуктом, полученным от фирмы Grunenthal GmbH, Aachen, Germany /N партии 0088808/.

25 мкг Аро или буфера;

75 мкл 0,05 моль/л Трис, pH 7,6, содержащего 0,1 моль/л NaCl и 0,02% Tween 80;

25 мкл ОЦ-УАП, конечная концентрация 5454 нмоль/л;

50 мкл S-2444, конечная концентрация 1 ммоль/л;

25 мкл/л плазминогена, конечная концентрация 52,1 нмоль/л.

Образцы инкубировали при 37°C в течение 90 минут. За увеличением оптической плотности, отражающей количество образующегося УАП, следили непрерывно в течение последних 20 минут инкубации /см. табл. 8/.

Превращение ОЦ-УАП в УАП в присутствии плазминогена стимулировалось Аро AI-M/Aro AI-M, в то время как Аро AI, выделенный из плазмы, не имел значительного влияния на эту систему.

Наблюдаемое действие Аро AI-M/Aro AI-M на систему, разрушающую фибрин, которая применялась в этом исследовании, было выше по сравнению с действием, показанным Аро AI, выделенным из плазмы. Аро AI-M/Aro AI-M обладает сильной способностью стимулировать активность, разрушающую фибрин, которая превышает подобную активность Аро AI. Вероятно, что этот превышающий эффект Аро AI-M/Aro AI-M по отношению к Аро AI также будет обнаружен *in vivo*.

Формула изобретения:

1. Димер апо-липопротеина AI-Milano, характеризующийся чистотой по меньшей мере 90%.

2. Димер по п.1, характеризующийся чистотой по меньшей мере 98%.

3. Димер по п.1 или 2, характеризующийся тем, что является полученным из плазмы крови носителей.

4. Димер по п.1 или 2, характеризующийся тем, что является полученным при помощи рекомбинантной технологии.

5. Димер по п.1, характеризующийся тем, что используется для изготовления лекарств при профилактике и лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

6. Димер по п.5, характеризующийся тем, что используется как пролекарство для мономера апо-липопротеина AI-Milano.

7. Димер по п.5 или 6, характеризующийся тем, что используется для профилактики и лечения основных заболеваний сердца и кровеносной системы, например инфаркта миокарда, неустойчивой ангины, внезапной закупорки периферических сосудов, а также во время восстановительного периода после пластических операций на венечных сосудах сердца.

8. Димер по п.5 или 6, характеризующийся

тем, что используется для лечения хронических артериальных заболеваний.

9. Димер по п.5 или 6, характеризующийся тем, что используется для профилактики и лечения тромбозов.

10. Димер по п.9, характеризующийся тем, что используется для стимуляции разрушения фибрина в организме.

11. Димер по п.1, характеризующийся тем, что используется для терапевтического лечения сердечно-сосудистых заболеваний путем его назначения в терапевтически действенном количестве с добавлением, возможно, носителя, стабилизирующего липидного соединения и/или терапевтически действенного количества агента, снижающего содержание липидов.

12. Фармацевтическая композиция, отличающаяся тем, что она включает димер апо-липопротеина AI-Milano, характеризующийся чистотой по меньшей мере 90%, в эффективном количестве.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она дополнительно включает носитель.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что в качестве носителя она включает липосому.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, отличающаяся тем, что она включает липосому, состоящую из фосфатидилхолина.

16. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, отличающаяся тем, что она дополнительно включает стабилизирующее соединение.

17. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, отличающаяся тем, что она дополнительно включает агент, снижающий содержание липидов.

18. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, отличающаяся тем, что она дополнительно включает стабилизирующее липидное соединение.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, отличающаяся тем, что она дополнительно включает агент, снижающий содержание липидов.

20. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, отличающаяся тем, что она дополнительно включает фосфолипид.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, отличающаяся тем, что она включает фосфолипид, выбранный из группы, состоящей из яичного фосфатидилхолина, пальмитоилолеил фосфатидилхолина и димеристоил фосфатидилхолина.

22. Фармацевтическая композиция по п.20, отличающаяся тем, что она дополнительно включает агент, снижающий содержание липидов.

23. Способ получения димера апо-липопротеина AI-Milano, заключающийся в том, что апо-липопротеин AI-Milano получают при помощи рекомбинантной технологии в виде внутриклеточного слитого белка в *E. coli*, после лизиса бактерий слитый белок очищают и расщепляют с помощью муравьиной кислоты, после чего полученный мономер апо-липопротеина AI-Milano окисляют до димера и очищают с получением целевого продукта, характеризующегося чистотой по меньшей мере 90%.

24. Способ получения димера апо-липопротеина AI-Milano, заключающийся

в том, что мономер апо-липопротеина AI-Milano получают при помощи рекомбинантной технологии в экспрессионной системе в *E. coli*, после чего выделенный в среду бактериальной культуры мономер окисляют до димера и очищают с получением целевого продукта, характеризующегося чистотой по меньшей мере 90%.

25. Способ получения димера апо-липопротеина AI-Milano, заключающийся в том, что собирают плазму крови носителей, из которой выделяют мономер апо-липопротеина AI-Milano, окисляют его до димера и очищают с получением целевого продукта, характеризующегося чистотой по

меньшей мере 90%.

26. Способ по любому из пп.23 - 25, заключающийся в том, что мономер апо-липопротеина AI-Milano окисляют до димера глутатионом или тиоредоксином.

5 27. Способ получения димера апо-липопротеина AI-Milano, заключающийся в том, что собирают плазму крови носителей, из которой выделяют апо-липопротеины высокой плотности, после чего отделяют с использованием хроматографии в несколько 10 этапов и очищают целевой продукт, характеризующийся чистотой по меньшей мере 90%.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Окисление Аро А1-М

Белок, мкМ	ГСН, мМ	ГССГ, мМ	Выход, %	Примечание
3,6	1,0	0,1	34,8	тиоредоксин, 0,2 мМ
8,9	1,0	2,0	9,1	
8,9	1,0	2,0	9,9	
8,9	1,0	4,0	7,2	4°C
8,9	1,0	4,0	7,7	
8,9	1,0	8,0	6,6	
8,9	1,0	16,0	5,2	Гдн-НС1-4М
8,9	2,0	4,0	19,6	
8,9	4,0	8,0	18,7	
8,9	5,0	10,0	23,9	
8,9	1,0	2,0	9,9	
17,9	2,0	4,0	23,3	
17,9	4,0	8,0	25,5	
17,9	5,0	10,0	27,5	
35,7	2,0	4,0	25,9	
35,7	4,0	8,0	27,7	
35,7	5,0	10,0	27,9	
53,6	2,0	4,0	25,4	
53,6	4,0	8,0	30,4	
53,6	5,0	10,0	38,1	

Условия реакции: Буфер: Трис-НС1 25 мМ, рН 9,0
Температура: 25°C
Время: 24 часа

Таблица 2

Характеристики булка Аро А1-М/Аро А1-М

	Аро А1-М/Аро А1-М	Аро А1-М/Аро А1-М + ДМФХ
Молекулярный вес /кД/	56,0	
Изоэлектрическая точка	5,3-5,6 ¹	
УФ-спектроскопия:		
Е /1 см, 1%/	16,6 ²	
Обнажение тирозина /альфа/		
Флуоресцентная спектроскопия:	0,75 ²	0,48 ²
Макс. длина волны в возб. сост. /нм/	280	280
Макс. длина волны при эмиссии /нм/		
КД-спектроскопия:	344	338
альфа-спираль, %	52,2 ² 57,78 ²	66,1 ²

¹ по крайней мере в изоформе в денатурированном геле для ИЭФ.
² высокое значение указывает на увеличение обнажения тирозина.
³ концентрация белка: 0,1 мг/мл.
⁴ концентрация белка: 1,1 мг/мл.

Таблица 3

Кинетическое поведение Аро А1-М в сравнении с мономером Аро А1-М у нормальных рецидивентов $t=2/$

		Аро А1-М	Аро А1-М/Аро А1-М
Одно-экспоненциальная модель	βt 1/2 /ч/	16,7	52,04
	СВУ /ч/	23,19	76,09
Дву-экспоненциальная модель	βt 1/2 /ч/	22,61	70,29
	СВУ /ч/	28,97	89,16
	СДР /ч/	2,3% в час	1,1% в час

Таблица 4

Спонтанное образование активности пламина из пламиногена. Эффект Аро А1-М/Аро А1-М и Аро А1. Активность выражена в виде ОП при 405 нм

Образец	Конечн. конц. Аро, мкг/мл	ОП при 405 нм
Контроль	0	0,052
+ Аро А1	125	0,049
+ Аро А1-М/Аро А1-М		
А	75	0,298
В	31,3	0,325
В	13,6	0,153
В	7,8	0,134
В	3,9	0,097

Таблица 5

Активность, разрушающая амидную связь, двух образцов Аро А1-М/Аро А1-М А и В/ через 4 часа инкубации при 37°C /ОП при 405 нм/

		Аро А1-М/Аро А1-М	субстрат
S-2251	А	0,023	0,022
	В	0,022	
S-2286	А	0,037	0,034
	В	0,037	

Таблица 6

Действие Аро А1-М/Аро А1-М на активацию пламиногена с участием ТАП в присутствии и отсутствии фибрина. Результаты выражены в виде ОП при 405 нм после 3 часов инкубации при 37°C

Образец	конечн. конц. Аро, мг/мл	ОП при 405 нм + фибрин	ОП при 450 нм - фибрин
ТАП контроль/	0	0,656	0,048
+ Аро А1	54	1,050	0,068
+ Аро А1-М/Аро А1-М			
А	85	1,685	0,446
В	54	2,366	0,225

Таблица 7

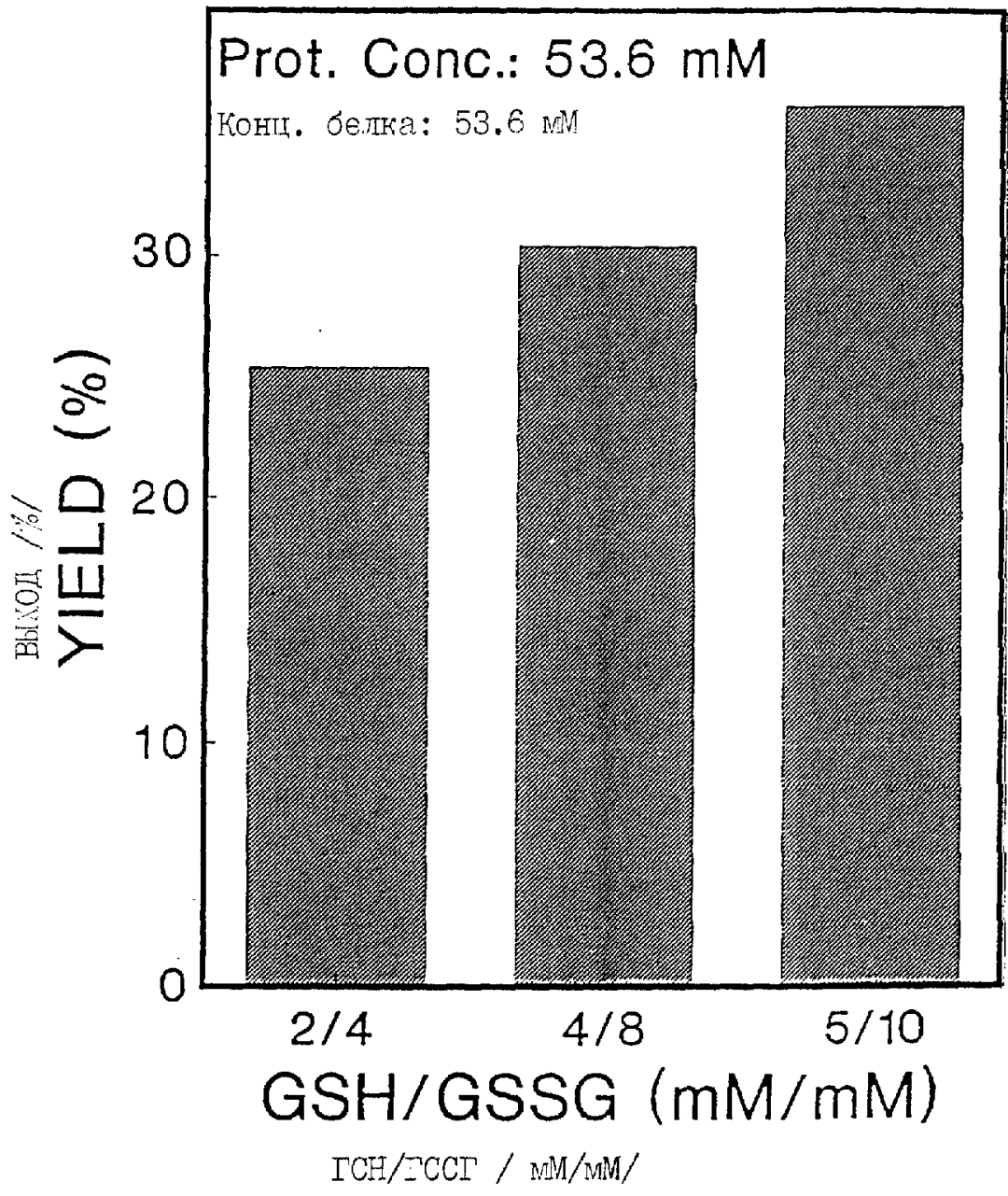
Действия Аро А1-М/Аро А1-М на активацию пламиногена при участии УАП. Результаты выражены в виде ОП при 450 нм через 4 часа инкубации при 37°C

Образец	Конечная концентрация Аро А1-М/Аро А1-М мг/мл	ОП при 450 нм
УАП контроль/	0	0,325
+ Аро А1-М/Аро А1-М		
А	75	1,263
В	62	1,868

Таблица 8

Действие Аро А1-М/Аро А1-М на превращение ОП-УАП в УАП. Результаты выражены в виде МОП/мин при 405 нм

Образец	Конечн. конц. Аро, мкг/мл	МОП/мин
ОЦ-УАП	0	0,073
+ пламиноген	0	13,2
+ Аро А1	62	11,8
+ Аро А1-М/Аро А1-М		
В	62	20,0
А	75	24,0

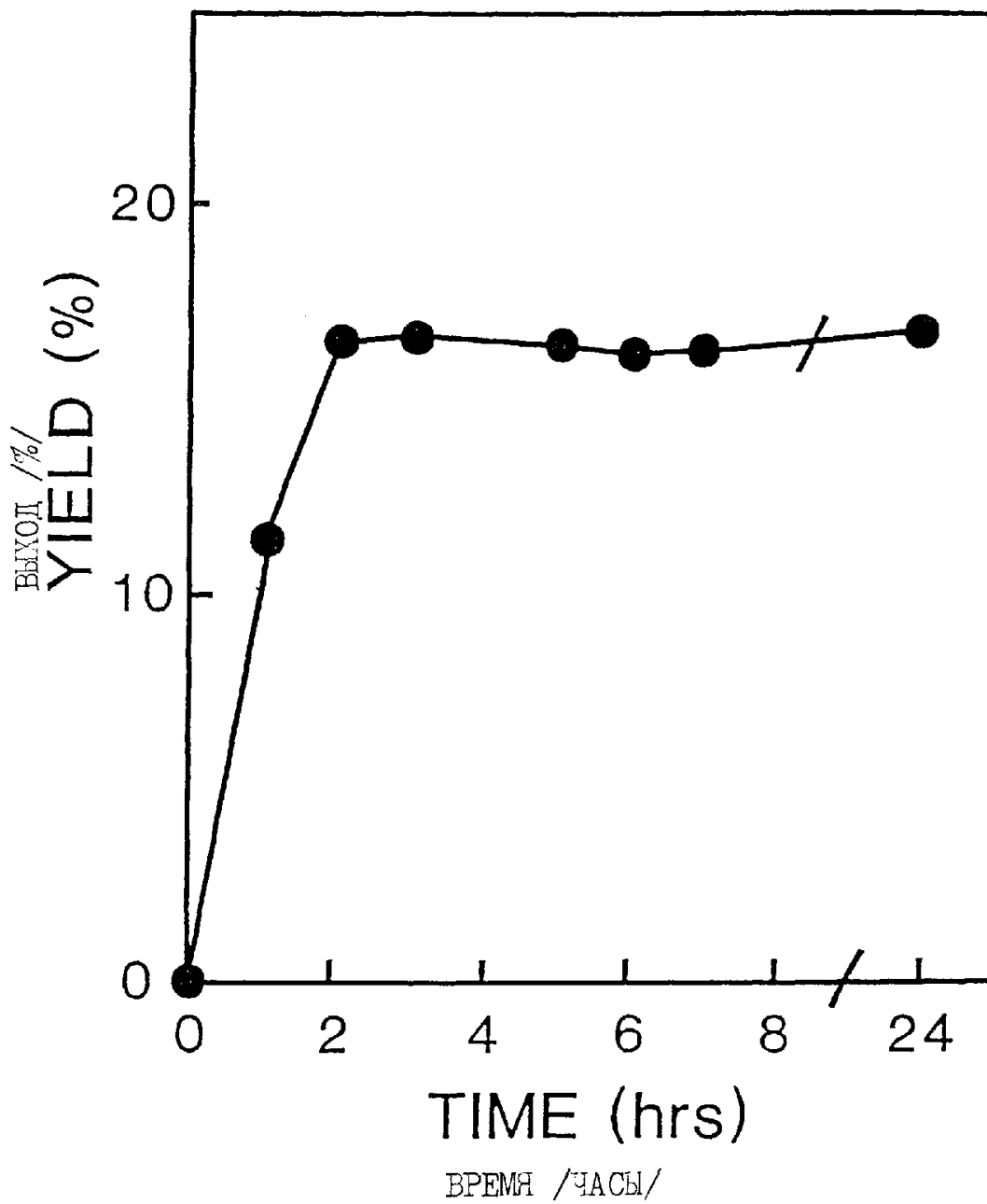


RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

Фиг.2

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1



Фиг.3

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

ЛИНКЕР

Linker-ΔApoAI-Eco

Длина линкера -ΔApoAI-Eco/кольцевой/: 28 п.о.;
Length of linker-ΔApoAI-Eco(circular): 28 bp;
Simple Restriction from: 1 to: 28;

Простая рестрикция от 1 до 28;

×	AvaII	×	BanII
		×	Bsp1286
×	EcoRI	×	DsaI
		×	EcoT141
		×	NcoI
		×	NspII
		×	StyI

GAATTCGGAC CCACCGCAGA GCCCATGG
AsnSerAsp ProProGlnSerProTrp
10 20 28

ΔApoAI-Eco-5 : 22 bp; +1 at: 1;
п.о.

5'-AATTOGGACC CACCGCAGAG CC
10 20 22

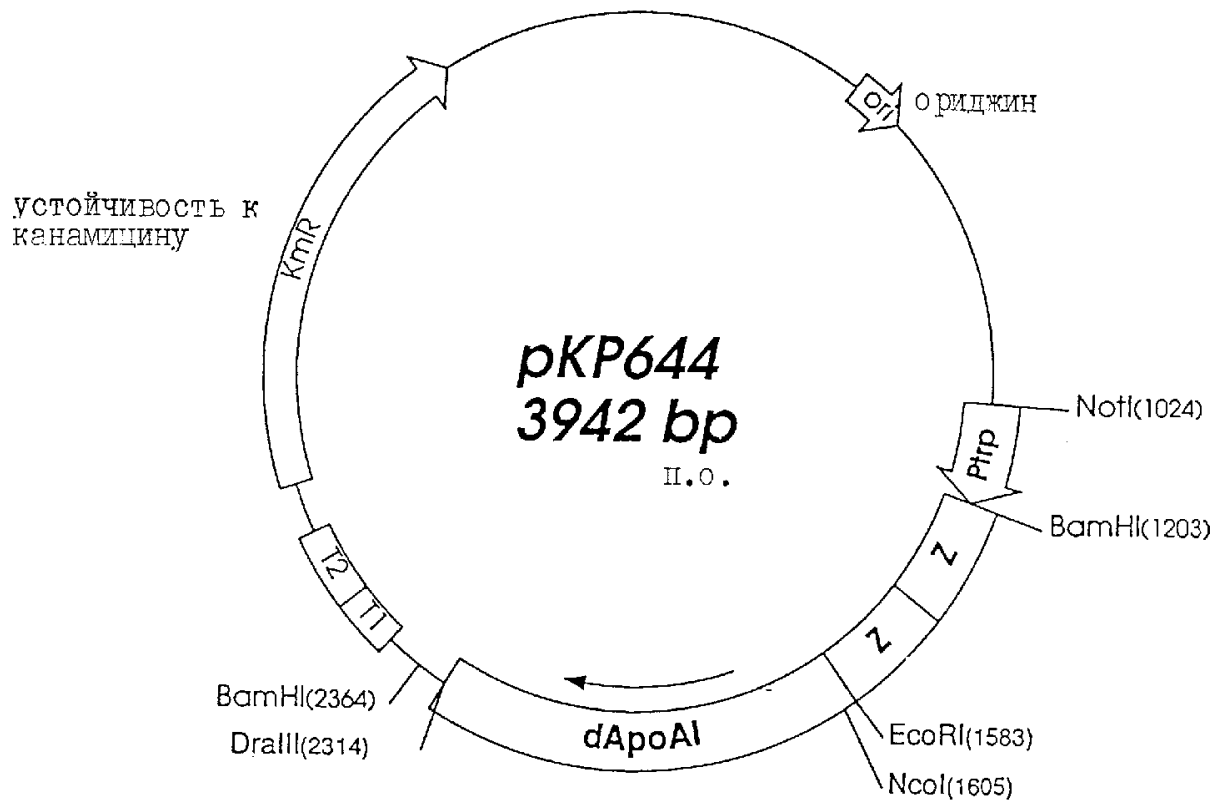
ΔApoAI-Eco-3 : 22 bp; +1 at: 1;
п.о.

5'-CATGGGCTCT GCGGTGGGTC CG
10 20 22

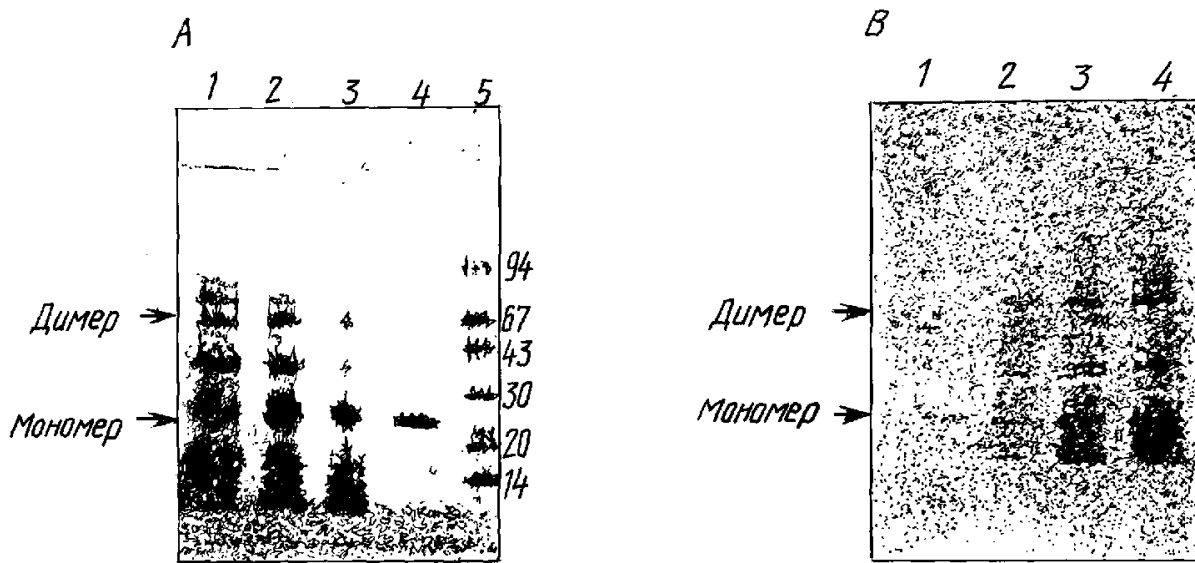
Фиг.4

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1

RU 2 1 3 4 6 9 6 C 1



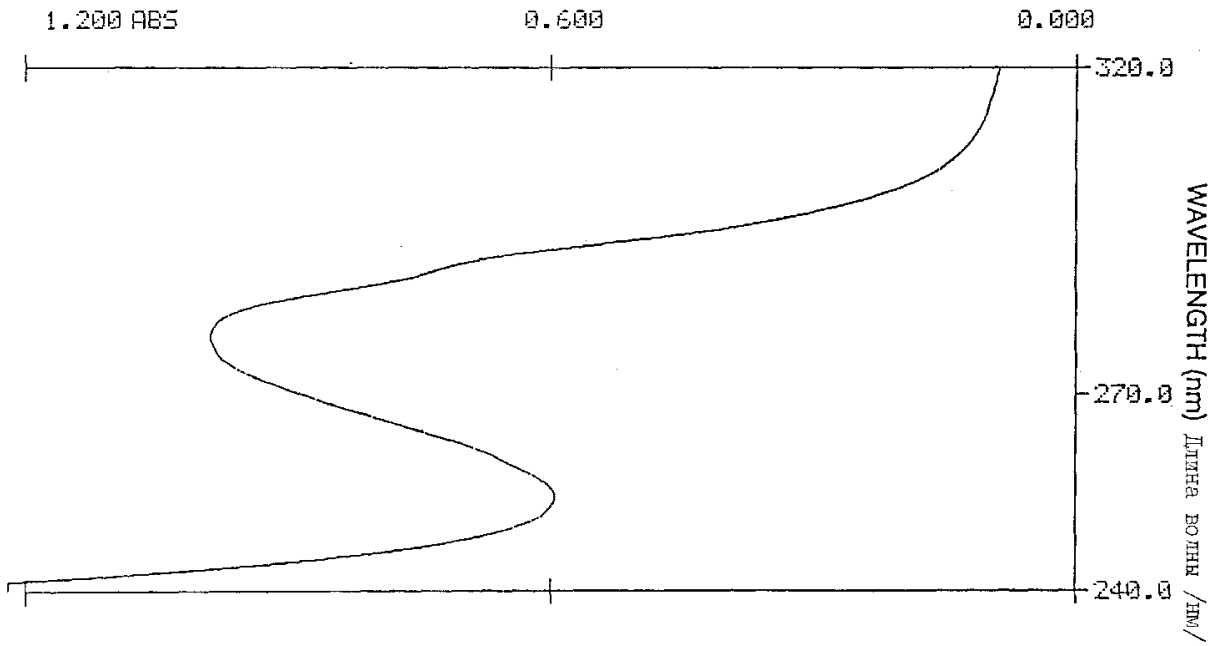
Фиг.5



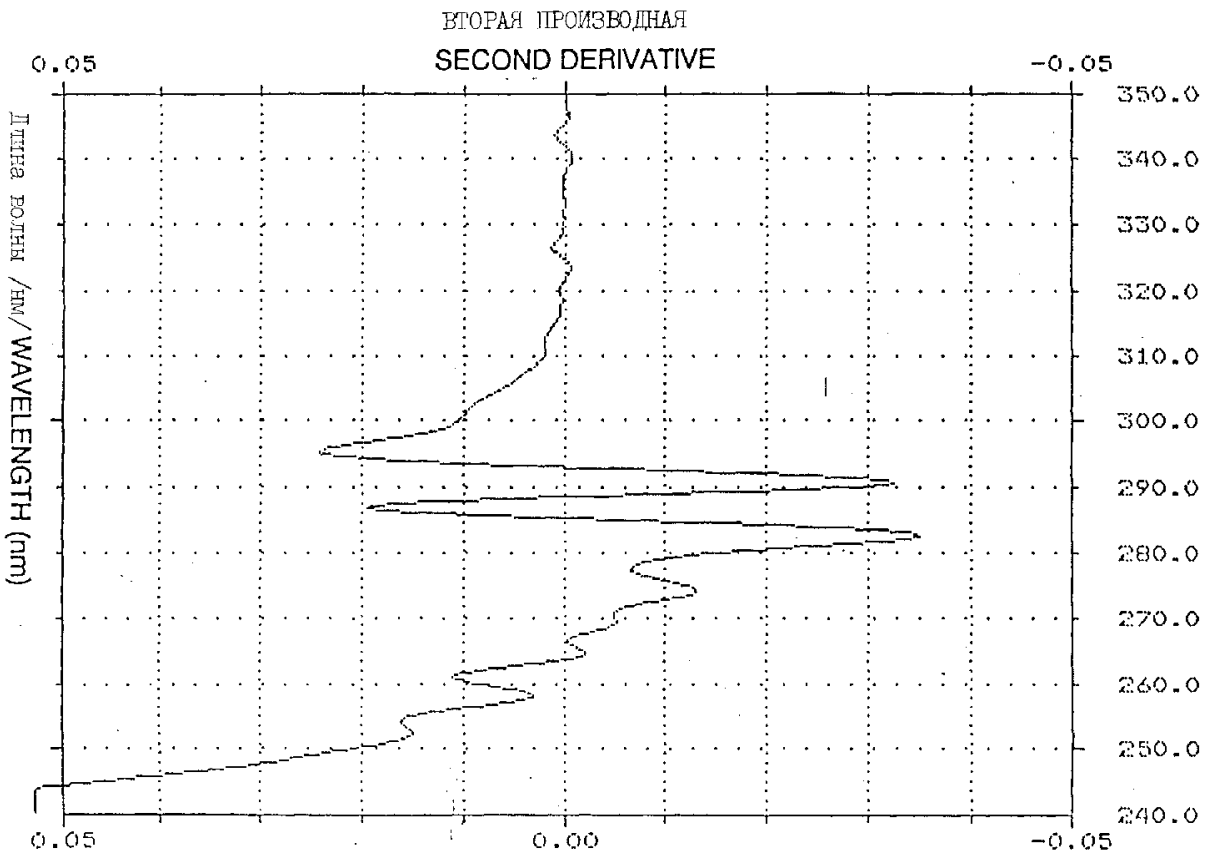
Фиг.6

RU 2134696 C1

RU 2134696 C1



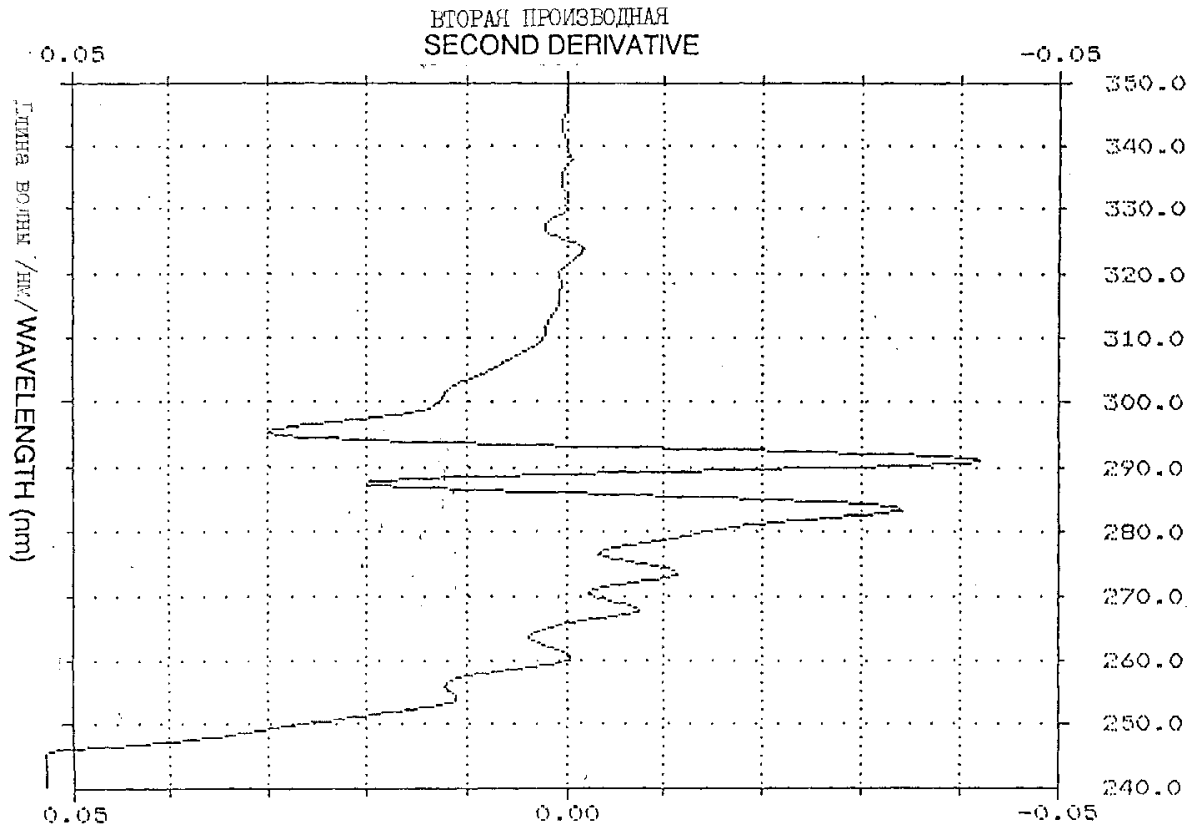
Фиг.7



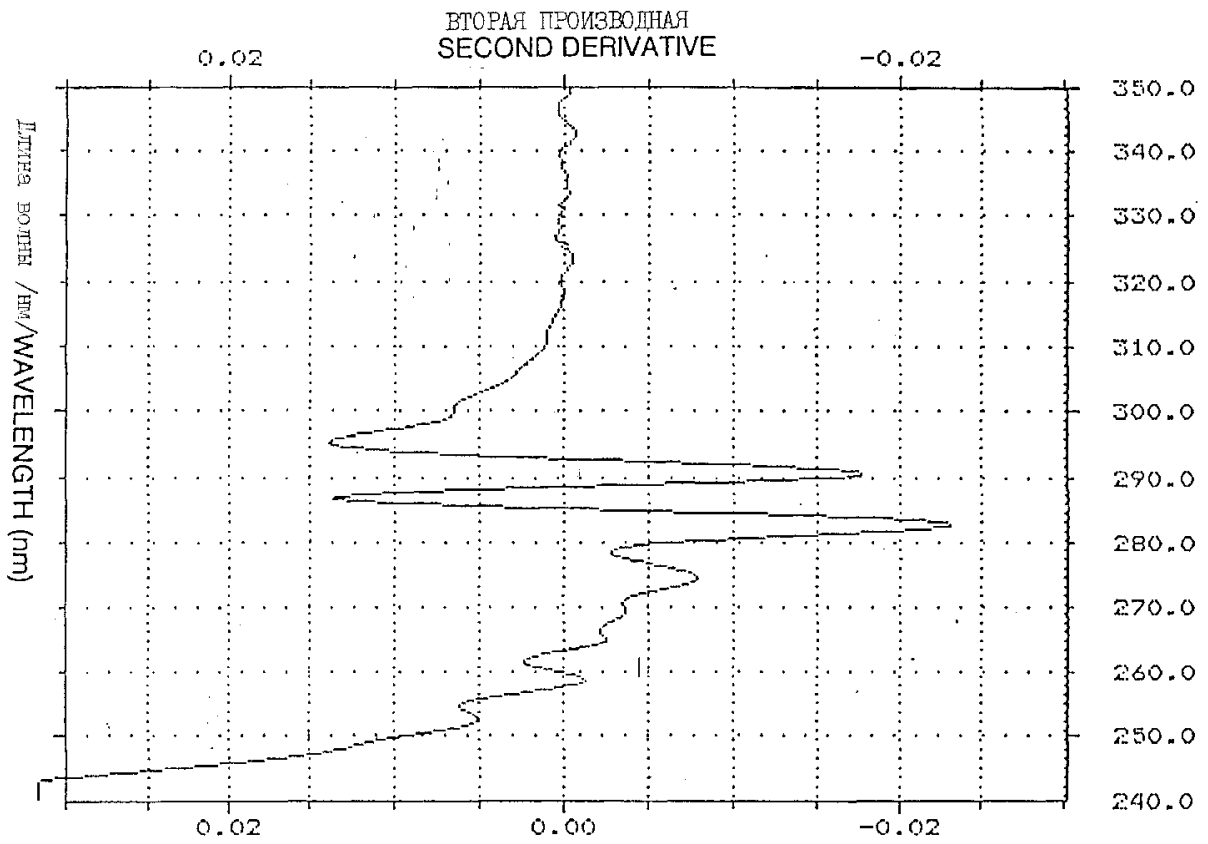
Фиг.8

RU 2134696 C1

RU 2134696 C1



Фиг.9

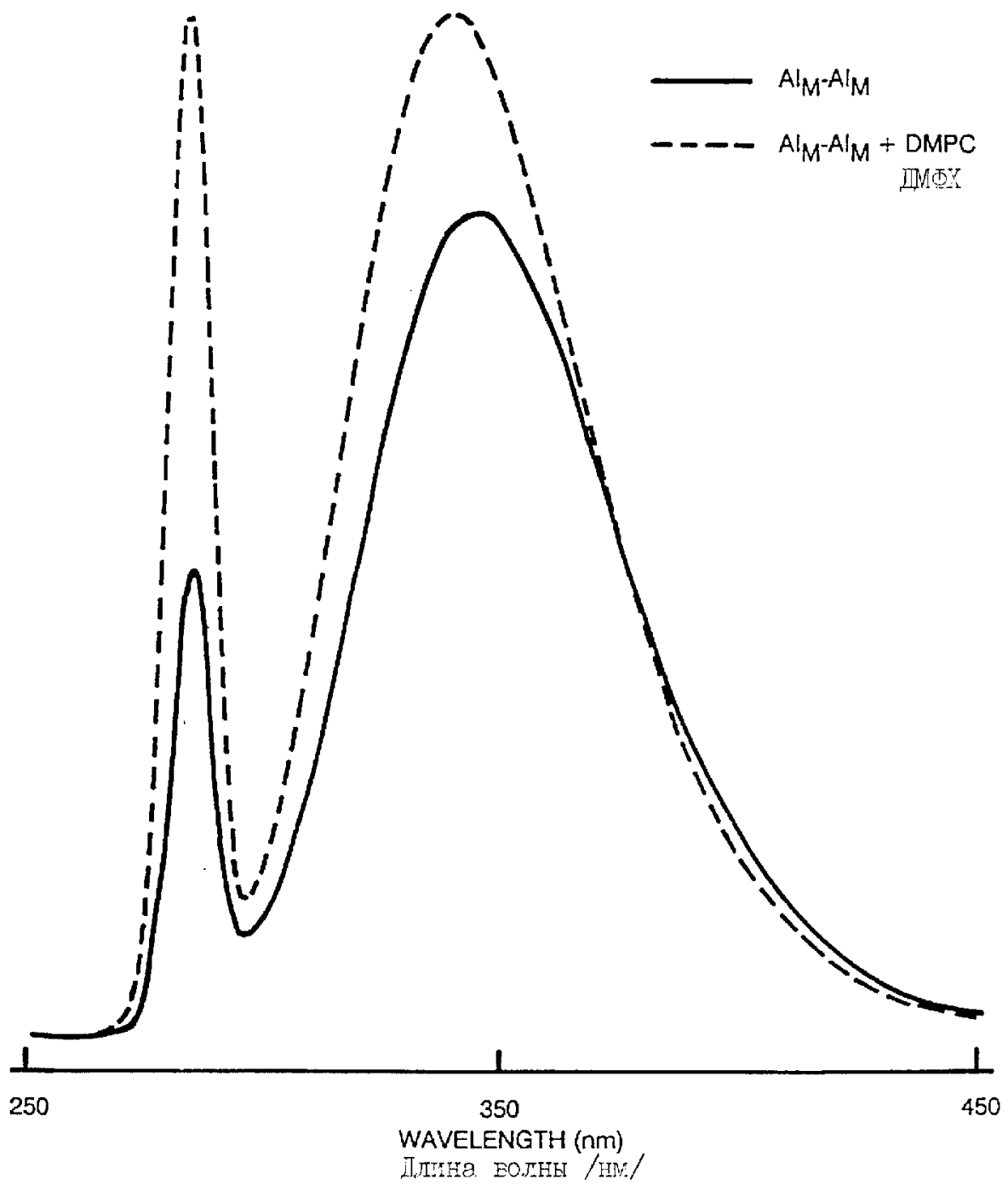


Фиг.10

RU 2134696 C1

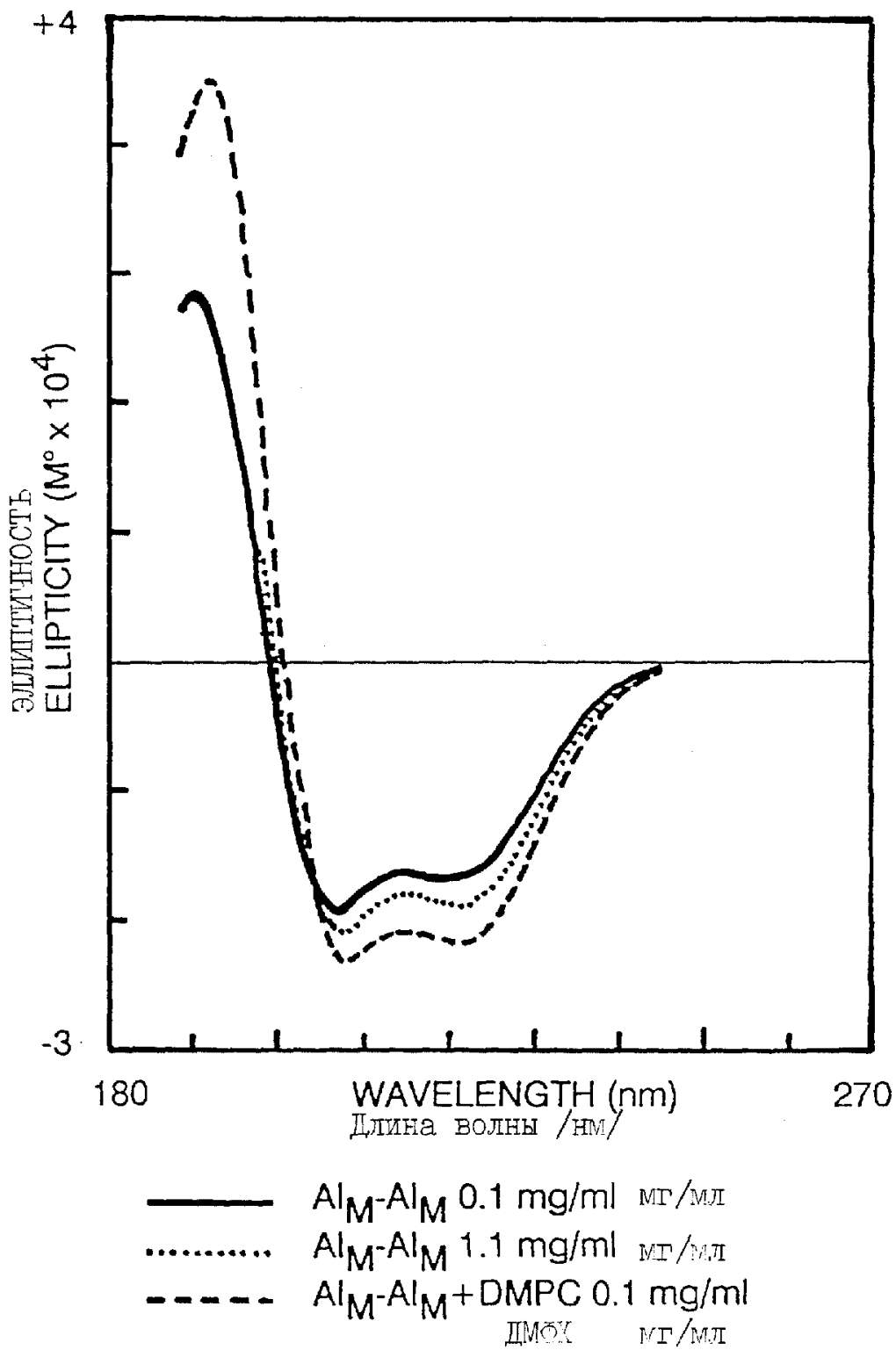
RU 2134696 C1

RU 2134696 C1

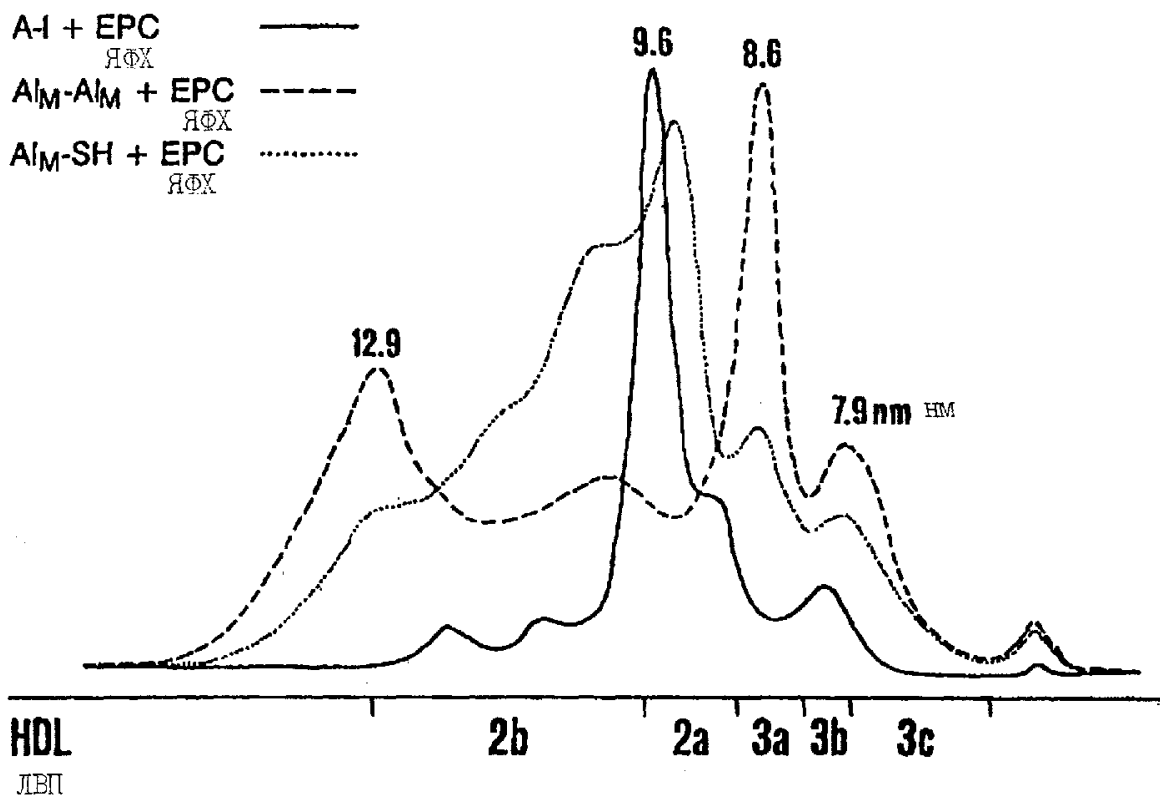


RU 2134696 C1

Фиг.11



Фиг.12



Фиг.13

RU 2134696 C1

RU 2134696 C1