



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013141487, 10.02.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.02.2012Дата регистрации:
09.11.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.02.2011 KR 10-2011-0012983

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2015 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 09.11.2017 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 16.09.2013(86) Заявка РСТ:
IB 2012/000259 (10.02.2012)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2012/110878 (23.08.2012)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский бульвар, 11, этаж
3, Гоулингз Интернэшнл Инк., Лью Т.Н.,
Дементьеву В.Н.

(72) Автор(ы):

ЛИ Джэ Мюн (KR),
ЁОН Чоо Чхуун (KR),
ПАРК Сан Вoo (KR),
КИМ Чон Сун (KR)

(73) Патентообладатель(и):

АТГен Ко. Лтд. ATGen Co. Ltd. (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: MIAN M.F., et al., Impairment of
human NK cell cytotoxic activity and cytokine
release by cigarette smoke. J Leukoc Biol. 2008
Mar;83(3):774-84. Epub 2007 Nov 30. CLAUS
M., et al., Comprehensive analysis of NK cell
function in whole blood samples. J Immunol
Methods. 2009 Feb 28;341(1-2):154-64. doi:
10.1016/j.jim.2008.11.006. Epub 2008 Dec 3. US
(см. прод.)**(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И НАБОР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ПУТЕМ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа измерения активности натуральных клеток-киллеров (НК-клеток), включающего стимулировать НК-клеток в образце цельной крови посредством инкубирования образца цельной крови со средством, включающим по меньшей мере один стимулирующий цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 15 и интерлейкина 18, и измерение количества

секретируемых НК-клетками цитокинов, секретируемых в образце цельной крови. Группа изобретений также касается набора для измерения активности натуральных клеток-киллеров. Группа изобретений обеспечивает большую точность измерения активности натуральных клеток-киллеров по сравнению с измерением активности натуральных клеток-киллеров с использованием РВМС. 3 н. и 21 з.п. ф-лы, 9 пр., 12 ил., 2 табл.

(56) (продолжение):

7,781,210 B2, 24.08.2010. FEHNIGER TA., et al., Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4511-20. KIM YM., et al., Expression

R U 2 6 3 5 1 9 4 C 2

R U 2 6 3 5 1 9 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013141487, 10.02.2012**

(24) Effective date for property rights:
10.02.2012

Registration date:
09.11.2017

Priority:

(30) Convention priority:
14.02.2011 KR 10-2011-0012983

(43) Application published: **27.03.2015** Bull. № 9

(45) Date of publication: **09.11.2017** Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: **16.09.2013**

(86) PCT application:
IB 2012/000259 (10.02.2012)

(87) PCT publication:
WO 2012/110878 (23.08.2012)

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, 11, etazh 3,
Goulingz Interneshnl Ink., Lyu T.N., Dementevu
V.N.**

(72) Inventor(s):

**LI Dzhe Myun (KR),
EON Choo Chkhuun (KR),
PARK San Voo (KR),
KIM Chon Sun (KR)**

(73) Proprietor(s):

ATGen Ko. Ltd. ATGen Co. Ltd. (KR)

(54) **METHOD FOR MALIGNANT TUMOUR DIAGNOSTICS AND DIAGNOSTIC KIT BY NK-CELLS ACTIVITY MEASUREMENT**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to a method for natural killer cells (NK cells) activity measurement comprising stimulation of NK cells in a whole blood sample by whole blood sample incubation with a means comprising at least one stimulating cytokine selected from the group consisting of interleukin 2, interleukin 15 and interleukin 18, and measurement of the amount of cytokines secreted by

the NK cells secreted in the whole blood sample. The group of inventions also concerns a kit for natural killer cells activity measurement.

EFFECT: group of inventions provides greater accuracy in natural killer cells activity measurement compared to natural killer cells activity measurement using PBMC.

24 cl, 9 ex, 12 dwg, 2 tbl

C 2
4 9 4
2 6 3 5 1 9 4
R U

R U
2 6 3 5 1 9 4
C 2

Ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на выдачу патента Кореи №2011-0012983, поданной 14 февраля 2011 года, раскрытие которой включено в настоящий документ при помощи ссылки в полном ее объеме.

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к способу диагностики злокачественной опухоли и набору для диагностики путем измерения активности НК-клеток.

Уровень техники

Известно, что натуральные клетки-киллеры (НК) принимают участие во врожденном
10 иммунитете, уничтожая патогены и злокачественные клетки и секретируя интерферон
гамма (IFN- γ), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), макрофагальный белок
воспаления 1 β (MIP-1 β) и другие молекулы, опосредуя приобретенный иммунитет. При
встрече НК-клеток с другими клетками НК-клетки задействуют механизм, в соответствии
с которым, если отсутствуют молекулы МНС 1 класса, как в случае злокачественных
15 клеток, или форма молекул класса МНС является нетипичной, как в случае
инфицированных вирусами клеток, то их молекулы главного комплекса
гистосовместимости (МНС) посылают сигналы НК-клеткам атаковать эти аномальные
клетки посредством молекулярных действий. Однако, сообщалось, что поскольку НК-
клетки характеризуются нарушениями функций и способностями к дифференцировке
20 при различных типах злокачественной опухоли, то активность НК-клеток тесно связана
с выживаемостью злокачественных клеток. Таким образом, проводится интенсивное
исследование с целью повышения количества или активности НК-клеток для
иммунотерапии злокачественной опухоли.

Что касается способов диагностики злокачественной опухоли, то они
25 преимущественно предусматривают обнаружение наличия злокачественной опухоли
по графическим изображениям, получаемым при помощи компьютерной томографии
(КТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) или рентгенограмм. Однако, поскольку
эти тесты обычно проводят только в случае, если пациент сильно нуждается в
выполнении тестов, по причине боли или неудобства, и их осуществляют только на
30 определенных тканях, то наличие злокачественной опухоли может быть упущено из
виду. Был разработан способ определения риска заболевания злокачественной опухолью
при помощи анализа крови, но его применение в качестве способа диагностики
злокачественной опухоли является ограниченным. Это связано с тем, что у пациента
может оказаться положительный результат на злокачественную опухоль при наличии
35 скорее этиологического фактора в соответствующем органе, а не самого
злокачественной опухоли, поскольку способ осуществляют с помощью опухолевых
маркеров в крови, как например, для злокачественной опухоли предстательной железы,
колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли яичников,
злокачественной опухоли поджелудочной железы или злокачественной опухоли печени.
40 Были также предприняты попытки диагностики злокачественной опухоли с помощью
антител, но такие попытки ограничены определенными типами злокачественных
опухолей.

Соответственно, по-прежнему существует необходимость в новых способах
диагностики различных типов злокачественных опухолей.

45 Сущность изобретения

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу, который может
применяться для диагностики и оценки злокачественной опухоли, а также к
применяемым в таком способе наборам и реактивам.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к способу измерения активности НК-клеток, при этом способ предусматривает стимулирование НК-клеток в образце крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, и измерение количества секретируемых НК-клетками цитокинов в образце крови.

В соответствии с определенными неограничивающими вариантами осуществления образец крови может представлять собой образец цельной крови, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) или НК-клеток.

В соответствии со следующими вариантами осуществления стимулирование НК-клеток может быть осуществлено путем инкубирования образца крови по меньшей мере с одним стимулирующим цитокином, включая интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 и интерлейкин 18 или их комбинации, или путем инкубирования образца крови с липополисахаридами (ЛПС) или полиинозиновой:полицитидиловой кислотой (поли И:Ц).

В соответствии с определенными вариантами осуществления секретируемые НК-клетками цитокины могут содержать интерферон-гамма (IFN- γ), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) или макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β).

В соответствии со следующими неограничивающими вариантами осуществления способа макрофагальный белок воспаления 1 ρ (MIP-1 ρ) может быть использован в качестве контрольной группы для сравнения активации НК-клеток у больного активацией у здорового человека.

Кроме того, в соответствии с определенными вариантами осуществления способ может быть выполнен с применением по меньшей мере одного стимулирующего цитокина, слитого со стабилизирующим пептидом. Например, и без ограничения, стабилизирующий пептид может представлять собой пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. В соответствии с такими вариантами осуществления стабилизирующие пептиды могут содержать аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO:22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO:23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO:24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO:25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO:27), аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO:29) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена синоретина (SEQ ID NO:29).

В соответствии со следующими вариантами осуществления этап стимулирования НК-клеток в образце крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, выполняют в среде, содержащей белок-носитель, например, сывороточный альбумин.

Описываемый способ является особенно пригодным для определения вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли. В соответствии с такими вариантами осуществления уменьшение количества секретируемых НК-клетками цитокинов у субъектов по сравнению с уровнями у здоровых индивидуумов является показателем вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к набору для измерения активности НК-клеток. Набор будет включать средство для стимулирования НК-клеток в образце крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов. Кроме того, набор может быть пригоден для осуществления описанного выше способа, который

предусматривает определение вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

В соответствии со следующими неограничивающими вариантами осуществления описанного набора секреторируемый НК-клеткой цитокин может представлять собой интерферон-гамма (IFN- γ) или фактор некроза опухоли альфа (TNF- α).

В соответствии со следующим вариантом осуществления средство для стимуляции НК-клеток в образце крови и искусственной активации НК-клеток к выработке секреторируемых НК-клетками цитокинов может содержать по меньшей мере один стимулирующий цитокин, ЛПС или поли И:Ц, при этом по меньшей мере один стимулирующий цитокин включает один или несколько из интерлейкина 2, интерлейкина 12, интерлейкина 15 и интерлейкина 18.

В соответствии с определенными вариантами осуществления описанный набор может также содержать одно или несколько из следующих: антитело к IFN- γ , антитело к TNF- α и антитело к MIP-1 β . Без ограничения тем или иным способом, набор может также дополнительно содержать инструкции для сравнения количества секреторируемых НК-клетками цитокинов у субъекта с уровнями у здоровых индивидуумов, при этом уменьшение уровня секреторируемых НК-клетками цитокинов у субъекта является показателем вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

В соответствии со следующим аспектом настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему цитокин, связанный с пептидом с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, при этом цитокин является либо интерлейкином 2, либо интерлейкином 12, либо интерлейкином 15, либо интерлейкином 18.

В соответствии с определенными неограничивающими вариантами осуществления описанного химерного белка, пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов может содержать аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO:23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO:24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO:25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO:27), аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO:29) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена синоретина (SEQ ID NO:29).

Также настоящее изобретение относится к содержащим описанный выше химерный белок композициям.

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам для диагностики злокачественной опухоли, содержащим либо описанные выше химерные белки, либо описанные выше композиции.

Описанный выше набор для диагностики злокачественной опухоли в соответствии с определенными неограничивающими вариантами осуществления может также включать по меньшей мере одно антитело из следующих: антитело к IFN- γ , антитело к TNF- α и антитело к MIP-1 β .

Настоящее изобретение также относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность по меньшей мере с 80% идентичностью по отношению к аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10. Без ограничения, полипептид может характеризоваться высокой процентной идентичностью, включая 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%

идентичность по отношению к последовательностям SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:10.

Настоящее изобретение также относится к олигонуклеотидам, кодирующим описанные выше химерные белки и полипептиды. Например, настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:9 или ее комплементарной последовательности. Такие олигонуклеотиды, без ограничения, могут характеризоваться более высокой процентной идентичностью, включая 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность, по отношению к последовательностям SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:9 или их комплементарным последовательностям.

Также настоящее изобретение относится к содержащим описанные выше олигонуклеотиды векторам, а также к содержащим такие векторы или олигонуклеотиды клеткам-хозяевам.

Краткое описание чертежей

Указанные выше и другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятны рядовым специалистам в данной области техники при подробном описании иллюстративных вариантов осуществления с привязкой к чертежам, на которых:

ФИГ.1 представляет собой схематическое изображение, демонстрирующее химерные продукты пептида SP, слитого либо с N-концом, либо с C-концом цитокина, включая hIL2, hIL12, hIL15 и hIL18.

ФИГ.2 представляет собой фотоснимок, демонстрирующий результаты электрофореза очищенных химерных белков SP.

На ФИГ.3 показана активность искусственно активированных у здорового человека НК-клеток по результатам анализа количества выработанного интерферона- γ при стимулировании НК-клеток отдельным цитокином (ФИГ.3А) или комбинированными цитокинами (ФИГ.3В-3Д).

ФИГ.4 представляет собой диаграмму, демонстрирующую цитокины, секретированные из искусственно активированных НК-клеток, при оценке посредством ИФА по типу сэндвича.

На ФИГ.5 показано сравнение белковой активности (А) и стабильности (В) между SP IL-2 и IL-2.

На ФИГ.6 показана активность НК-клеток у здоровых людей и больных злокачественным заболеванием, которых обработали отдельно SP IL-2 (10 нг/мл) (условие А) и SP IL-2 (5 нг/мл)+IL-12 (5 нг/мл) (условие В).

ФИГ.7 представляет собой диаграмму, демонстрирующую способность НК-клеток секретировать интерферон- γ у Т-клеток, НК-клеток, цельной крови и МКПК в зависимости от стимулирующего действия IL2.

ФИГ.8 представляет собой диаграмму, демонстрирующую разницу в количестве секретлируемого из НК-клеток у здорового человека интерферона- γ при стимуляции ЛПС.

ФИГ.9 представляет собой диаграмму, демонстрирующую разницу в способности НК-клеток секретировать интерферон- γ в зависимости от концентраций IL12 и IL15 при обработке и различии композиций сред.

ФИГ.10 представляет собой диаграмму, демонстрирующую различие в количестве

секретируемого интерферона- γ в зависимости от стадии прогрессирования злокачественной опухоли.

На ФИГ.11 показаны результаты анализа интерферона- γ , выработанного НК-клетками здорового человека, при стимуляции цитокинами в планшете для ИФА.

5 На ФИГ.12 показаны результаты проточной цитометрии цельной крови от здоровых людей при стимуляции цитокинами.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу, набору и реактивам для диагностики вероятности возникновения злокачественной опухоли с помощью взаимосвязи злокачественной опухоли с НК-клетками.

10 С этой целью предлагается способ измерения активности НК-клеток, предусматривающий стимулирование НК-клеток в образце крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, и измерение количества секретируемых НК-клетками цитокинов в образце крови.

15 Было обнаружено, что исходя из наблюдений, что активность НК-клеток является сниженной у больных злокачественным заболеванием, вероятность возникновения злокачественной опухоли можно преимущественно отслеживать путем измерения активности НК-клеток. С помощью описываемого в настоящем документе способа можно определить нормально функционируют НК-клетки или нет, как правило, подавая искусственный стимул НК-клеткам, и измерить уровень активации НК-клеток путем определения изменений количества присутствующих в образце крови секретируемых НК-клетками цитокинов, что отличается от других способов, которые предусматривают просто измерение изначально присутствующих в образце крови числа НК-клеток или количества цитокинов. Например, в традиционном способе измерения уровня активации

25 НК-клеток анализ по высвобождению ^{51}Cr применяли в качестве способа измерения направленной на мишень цитотоксичности. Однако при измерении активности НК-клеток таким способом необходимо было применять радиоактивный изотоп, а измерение и анализ являются затруднительными, сложными и дорогостоящими. Поэтому анализ не подходит для применения при скрининг-анализе/способах тестирования первичного злокачественной опухоли, с помощью которых можно просто диагностировать вероятность возникновения злокачественной опухоли. С другой стороны, в соответствии с настоящим изобретением, поскольку активность НК-клеток может быть измерена путем стимулирования НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов и количественного определения выработанных секретируемых НК-клетками цитокинов, субъект, у которого снижена активность НК-клеток, может быть преимущественно отобран как страдающий злокачественной опухолью или подверженный риску заболевания злокачественной опухолью субъект.

40 В соответствии с настоящим изобретением образец крови может включать без ограничения цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и НК-клетки, которые берут у субъекта. Вместо цельной крови МКПК или НК-клетки могут быть использованы интактными, но в соответствии с определенными вариантами осуществления применение цельной крови может быть преимущественным ввиду более простой методики и сниженных затрат.

45 При этом в соответствии с настоящим изобретением, термин "субъект" относится к млекопитающему, у которого есть подозрение на заболевание злокачественной опухолью или на наличие рецидивирующего злокачественной опухоли, или которое хочет определить вероятность возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

Присутствующие в образце крови НК-клетки обычно присутствуют в

инактивированном состоянии. В соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере один цитокин, липополисахарид (ЛПС) или полиинозиновая:полицитидиловая кислота (поли И:Ц) может быть использован в качестве средства, также называемого в настоящем документе агонистом или активатором, которое служит для стимуляции таких МК-клеток в образце крови и искусственной активации МК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов. В таком случае применяемый для активации НК-клеток цитокин может представлять собой интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 и интерлейкин 18 или их комбинации. Интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15, интерлейкин 18, ЛПС или поли И:Ц широко известны в данной области техники как стимулирующие к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов. Поэтому, в соответствии с одним из иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения, стимуляция НК-клеток может быть осуществлена путем инкубирования образца крови по меньшей мере с одним цитокином, включая интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 и/или интерлейкин 18, или путем инкубирования образца крови с ЛПС или поли И:Ц.

В соответствии с одним неограничивающим вариантом осуществления стимуляция НК-клеток может быть осуществлена путем инкубирования образца крови с интерлейкином 2. Интерлейкин 2 является одним из секретируемых Т-клетками цитокинов, и известно, что он ассоциирован с активацией НК-клеток Т-клетками при адаптивном иммунном ответе *in vivo*. Также интерлейкин 2 представляет собой цитокин, который обычно широко используется для активации НК-клеток *in vitro*. Следовательно, стимуляция НК-клеток может быть осуществлена путем инкубирования образца крови с интерлейкином 2.

В соответствии с другим неограничивающим вариантом осуществления стимуляция НК-клеток может быть осуществлена путем инкубирования образца крови с интерлейкином 2 и интерлейкином 12. В случае с больными злокачественным заболеванием на ранней стадии активность Т-клеток может быть высокой даже при низкой активности НК-клеток. В отличие от этого, в случае с больными злокачественным заболеванием на поздней стадии, активность Т-клеток, а также НК-клеток может быть низкой. Интерлейкин 12 принимает участие в активации Т-клеток, а также НК-клеток. Таким образом, при обработке интерлейкином 12 с интерлейкином 2 секретируемые вследствие стимуляции Т-клеток цитокины добавляют к секретируемым НК-клетками цитокинам. Поэтому можно оценить общий уровень иммунитета, а также противораковый иммунитет НК-клеток и использовать этот уровень в качестве маркера, демонстрирующего степень развития злокачественной опухоли или прогноз лечения злокачественной опухоли. Интерлейкин 15 и интерлейкин 18 являются секретируемыми активированными дендритными клетками и макрофагами цитокинами и индуцируют активацию и рост НК-клеток в ходе врожденного иммунного ответа *in vitro*. В частности, при объединении интерлейкина 12 с интерлейкином 15 или интерлейкином 18 для стимулирования у НК-клеток секреции секретируемых НК-клетками цитокинов может быть использовано относительно малое количество интерлейкина 12. Таким образом, стимуляция НК-клеток может быть эффективно осуществлена путем инкубирования образца крови с интерлейкином 12 и интерлейкином 15 или с интерлейкином 12 и интерлейкином 18.

В соответствии с настоящим изобретением цифровую величину секретируемых НК-клетками цитокинов применяют в качестве критерия для оценки активности НК-клеток. В соответствии с настоящим изобретением фраза "секретируемые НК-клетками цитокины" относится к цитокинам, которые секретируются НК-клетками, в частности

цитокинам из активированных при помощи искусственной стимуляции НК-клеток. В соответствии с одним вариантом осуществления секретируемые НК-клетками цитокины являются по меньшей мере одним цитокином, выбранным из группы из интерферона-гамма (IFN- γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и макрофагального белка воспаления 1 β (MIP-1 β). Интерферон- γ секретируется НК-клетками, дендритными клетками, цитотоксическими Т-клетками, Th1-клетками и т.п. и известен в качестве цитокина, который играет важную роль во врожденном иммунитете и приобретенном иммунитете для борьбы с злокачественной опухолью. Также, фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) уничтожает злокачественные клетки и дополнительно принимает участие в киллинге инородного объекта, такого как бактерия, индуцируя активацию Т-клеток и играя роль добавочного фактора для продуцирования антитела В-клетками. Поэтому, например, если цифровая величина интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа меньше, чем цифровая величина интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа у здорового человека, то это указывает на то, что существует проблема с активностью НК-клеток для борьбы с злокачественной опухолью. Следовательно, можно определить активность НК-клеток путем сравнения количества секретируемого искусственно активированными НК-клетками интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа с количеством интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа у здорового человека.

При этом макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β) может быть использован в качестве контрольной группы для сравнения активации НК-клеток. Как показано в последующих примерах, цифровая величина макрофагального белка воспаления 1 β (MIP-1 β) является одинаково высокой как у здоровых людей, так и у больных злокачественным заболеванием. Таким образом, макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β) может быть использован для анализа активности НК-клеток у здоровых людей и больных злокачественным заболеванием или может быть использован в качестве контрольной группы для анализа с помощью набора для диагностики злокачественной опухоли.

Количественное определение секретируемых НК-клетками цитокинов может быть осуществлено при помощи любых известных в данной области способов, но настоящее изобретение ими не ограничивается. Например, количественное определение интерферона- γ может быть осуществлено при помощи твердофазного иммуноферментного анализа интерферона- γ (ИФА интерферона- γ).

При этом по меньшей мере один цитокин, включая интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 или интерлейкин 18, который применяют в качестве средства, служащего для стимуляции НК-клеток в образце крови и искусственной активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, может находиться в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом.

Интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 или интерлейкин 18 в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом может обеспечить аналогичную биологическую активность и высокую стабильность при хранении по сравнению с интерлейкином 2, интерлейкином 12, интерлейкином 15 или интерлейкином 18 дикого типа. Например, если цитокин связан с таким стабилизирующим пептидом, то цитокин имеет изначальную активность, в то время же сохраняя стабильность, несмотря на такие изменения в окружающей среде, как лиофилизация.

Стабилизирующий пептид может быть связан N- или C-концом интерлейкина 2, интерлейкина 12, интерлейкина 15 или интерлейкина 18, и получение такого химерного белка может быть осуществлено при помощи известных способов получения химерных белков.

В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом (аминокислотной последовательностью кислого хвоста альфа-синуклеина, ATS) семейства синуклеинов может быть использован в качестве стабилизирующего пептида, который может быть связан с интерлейкином 2, интерлейкином 12, интерлейкином 15 или интерлейкином 18, но настоящее изобретение не ограничивается этим. В зарегистрированном патенте Кореи №10-0506766 раскрывается, что пептид ATS придает белку-партнеру в химерном белке устойчивость к воздействиям окружающей среды.

В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления стабилизирующий пептид, который может быть использован в соответствии с настоящим изобретением, включает стабилизирующий пептид, выбранный из аминокислотных остатков 103-115, аминокислотных остатков 114-126, аминокислотных остатков 119-140 и аминокислотных остатков 130-140 С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотных остатков 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина, аминокислотных остатков 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина и аминокислотных остатков 96-127 С-концевого кислого хвостового домена синоретина. В соответствии с настоящим изобретением аминокислотную последовательность пептида ATS, пептид ATS и способ получения включающего их химерного белка можно осуществить с помощью способа, раскрытого в зарегистрированном патенте Кореи №10-0506766. Если обратиться к последующим примерам, то в них показано, что слитый с пептидом ATS интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 или интерлейкин 18 имеет высокую стабильность и проявляет сходную с версией дикого типа активность при активации цитокина Т-лимфоцитом.

В соответствии с одним вариантом осуществления этап стимулирования НК-клеток в образце крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, может быть осуществлен в содержащей белок-носитель среде. Белок-носитель отвечает за стабилизацию цитокинов, таких как интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 или интерлейкин 18, которые используются в качестве средства для стимуляции НК-клеток в образце крови и искусственной активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов и, таким образом, для индукции НК-клеток к продуцированию большего количества секретируемых НК-клетками цитокинов. Белок-носитель, в соответствии с определенными вариантами осуществления, может представлять собой бычий сывороточный альбумин или человеческий сывороточный альбумин, но не ограничивается ими.

При этом, способ измерения активности НК-клеток может быть использован для скрининг-анализа вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

Активность НК-клеток может быть измерена путем сравнения количества секретируемых НК-клетками цитокинов, которые секретируются искусственно активированными НК-клетками, с количеством секретируемых НК-клетками цитокинов у здорового человека. В этом случае, если количество секретируемых НК-клетками цитокинов меньше, чем количество секретируемых НК-клетками цитокинов у здорового человека, то активность НК-клеток считают сниженной. Следовательно, можно оценить риск заболевания злокачественной опухолью или рецидива злокачественной опухоли. Если активность НК-клеток снижена по сравнению со здоровым человеком, субъект может быть первично классифицирован как страдающий злокачественной опухолью пациент или больной рецидивирующей злокачественной опухолью. Также, вероятность заболевания или рецидив злокачественной опухоли могут быть диагностированы

посредством дополнительного диагностического способа, такого как КТ, МРТ или позитрон-эмиссионная томография (ПЭТ) для обычно осуществляемой диагностики злокачественной опухоли, и посредством завершающего анализа ткани. Хотя способ в соответствии с настоящим изобретением не является способом окончательной
5 диагностики злокачественной опухоли, способ имеет хорошее преимущество в том, что может быть осуществлен первичный скрининг-анализ на вероятность возникновения или рецидив злокачественной опухоли с помощью образца крови.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для измерения активности НК-клеток, который включает средство, такое как агонист или активатор, которое
10 служит для стимуляции НК-клеток в образце крови и искусственной активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов. Такой набор для измерения активности НК-клеток может быть использован для быстрого осуществления вышеупомянутого способа измерения активности НК-клеток.

В наборе для измерения активности НК-клеток средство, которое служит для
15 стимуляции НК-клеток и искусственной активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, может представлять собой меньшей мере один цитокин, ЛПС или поли И:Ц, и такой цитокин может быть выбран из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 12, интерлейкина 15 и интерлейкина 18.

Кроме средства, которое служит для стимуляции НК-клеток и искусственной
20 активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, таких как интерферон- γ , такой набор для диагностики злокачественной опухоли может включать дополнительные компоненты для измерения активности НК-клеток, например, антитело для количественного определения секретируемых НК-клетками цитокинов и подложку. В соответствии с одним вариантом осуществления набор по настоящему изобретению
25 дополнительно содержит по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы из антитела к IFN- γ , антитела к TNF- α и антитела к MIP-1 β .

Антитело в наборе по настоящему изобретению может быть зафиксировано на твердой подложке. Антитело может быть зафиксировано при помощи различных
30 способов, которые описаны в литературе (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). Подходящая твердая подложка может включать планшет для клеточной культуры, планшет для ИФА, пробирку и полимерную пленку. Кроме того, твердая подложка включает металлический каркас, синтетическое стекло, агарозную гранулу, чашку, плоский корпус или другие пленки или покрытия, которые поддерживаются твердыми носителями или прикреплены к ним.

Также, набор в соответствии с настоящим изобретением может включать
35 применяемый для иммунологического анализа реактив с антителом, избирательно распознающим секретируемые НК-клетками цитокины, такие как интерферон- γ . Иммунологический анализ может включать все способы, с помощью которых может быть измерено связывание антигена с антителом в соответствии с настоящим
40 изобретением. Такие способы известны в данной области и включают, например, иммуноцитохимию и иммуногистохимию, радиоиммуноанализ, ИФА, иммуноблоттинг, анализ по Фарру, реакцию с преципитином, турбидиметрический способ, иммунодиффузию, противоточный электролиз, однорадикальную иммунодиффузию и иммунофлуоресценцию.

Применяемый для иммунологического анализа реактив включает подходящий
45 носитель, способную генерировать определяемый сигнал метку, растворитель и детергент. Также, если материалом метки является фермент, то реактив может включать субстрат, с помощью которого можно измерить ферментативную активность, и средство

для остановки реакции. Подходящий носитель может включать без ограничения растворимый носитель, например, один из известных в данной области физиологически доступных буферов (например, PBS) или нерастворимый носитель, например, полимер, такой как магнитные частицы, образованные путем нанесения металла на полистирол, полиэтилен, полипропилен, полиэфир, полиакрилонитрил, фторсодержащую смолу, 5 шиваемый декстран, полисахарид, и латекс, и другие виды бумаги, стекла, металлов, агарозы и их комбинаций.

В качестве метки, которая может генерировать определяемый сигнал, может быть использован фермент, флуоресцирующий материал, люминесцирующий материал и радиоактивный материал. В качестве фермента может быть использована пероксидаза, щелочная фосфатаза, β -D-галактозидаза, глюкооксидаза, малатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, инвертаза и т.п., а в качестве люминесцирующего материала может быть использован изотиоцианат флюоресцеин или фикобилипротеин, и в качестве радиоактивного материала могут быть использованы I_{131} , C_{14} или H_3 . Помимо 10 приведенных в качестве примера материалов в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любые материалы, которые могут быть использованы для иммунологического анализа.

Кроме того, настоящее изобретение относится к химерному белку, включающему цитокин, связанный с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. В этом случае цитокин может представлять собой интерлейкин 2, интерлейкин 12, интерлейкин 15 или интерлейкин 18. Как описано выше, химерный белок может быть использован в качестве средства, которое служит для стимуляции НК-клеток и искусственной активации НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов и обеспечивает более высокую стабильность, несмотря на изменения 25 в окружающей среде, такие как лиофилизация или долгосрочное хранение, по сравнению с интерлейкином 2, интерлейкином 12, интерлейкином 15 или интерлейкином 18 дикого типа.

В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления химерный белок может представлять собой химерный белок, в котором интерлейкин 2 связан с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. 30

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления химерный белок может представлять собой химерный белок, в котором интерлейкин 12 связан с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов.

В соответствии с еще одним иллюстративным вариантом осуществления химерный белок может представлять собой химерный белок, в котором интерлейкин 15 связан с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. 35

В соответствии с еще одним иллюстративным вариантом осуществления химерный белок может представлять собой химерный белок, в котором интерлейкин 18 связан с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов.

Пептид с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов в химерном белке может также быть выбран из аминокислотных остатков 103-115, аминокислотных остатков 114-126, аминокислотных остатков 119-140 и аминокислотных остатков 130-140 C-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотных остатков 85-134 C-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина, аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина и аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена синоретина. 45

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению химерного белка для активации НК-клеток. Как описано выше, такой химерный белок может быть

использован для активации NK-клеток в крови с тем, чтобы способствовать секреции секретируемых NK-клетками цитокинов.

Следовательно, настоящее изобретение относится к композиции для активации NK-клеток. В этом случае композиция включает по меньшей мере один химерный белок, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 12, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 15, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, и интерлейкина 18, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов.

В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления пептид с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов может быть выбран из аминокислотных остатков 103-115, аминокислотных остатков 114-126, аминокислотных остатков 119-140 и аминокислотных остатков 130-140 C-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотных остатков 85-134 C-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина, аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина и аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена синоретина.

При этом, композиция для активации NK-клеток помимо слитых со стабилизирующим пептидом цитокинов может включать буфер, способный поддерживать и сохранять химерный белок.

Более того, настоящее изобретение относится к набору для диагностики злокачественной опухоли, который включает по меньшей мере один химерный белок, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 12, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 15, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, и интерлейкина 18, связанного с пептидом с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. Как описано выше, при инкубации взятого от субъекта образца крови с химерным белком в образце крови активируются NK-клетки. Следовательно, активность NK-клеток у субъекта может быть измерена количественным определением выработанного в результате активации NK-клеток интерферона- γ , таким образом первично диагностируя злокачественную опухоль путем классификации субъектов, которые имеют более низкую активность NK-клеток, чем активность у здорового человека, как подверженных риску заболевания злокачественной опухолью или имеющих рецидив злокачественной опухоли пациентов.

В соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления пептид с C-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов может быть выбран из аминокислотных остатков 103-115, аминокислотных остатков 114-126, аминокислотных остатков 119-140 и аминокислотных остатков 130-140 C-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотных остатков 85-134 C-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотных остатков 85-134 C-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина, аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина и аминокислотных остатков 96-127 C-концевого кислого хвостового домена синоретина.

Помимо химерного белка такой набор для диагностики злокачественной опухоли может включать дополнительные компоненты, применяемые для осуществления способа диагностики в соответствии с настоящим изобретением, например, антитело для

количественного определения секретируемых НК-клетками цитокинов и подложку. Эти компоненты описаны выше в связи с набором для измерения активности НК-клеток. Также в набор могут быть включены инструкции для применения этих компонентов в описанном выше способе.

5 Понятно, что эти и другие признаки, аспекты и преимущества предпочтительных вариантов осуществления по настоящему изобретению будут более полно описаны в последующих примерах. Также следует понимать, что эти примеры приведены лишь с целью иллюстрации и не предполагают ограничение объема настоящего изобретения. Специалисту в данной области будет понятно, что другие аналоги и модификации могут
10 быть осуществлены без отклонения от заявленного объема настоящего изобретения.

Примеры

Пример получения 1: Построение вектора экспрессии с химерным белком стабилизирующего пептида-IL

Для получения IL-2, IL-12 IL-15 или IL-18, слитого со стабилизирующим пептидом,
15 строили вектор экспрессии. Содержащий аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина (SEQ ID NO: 24; называемый далее "SP") пептид использовали в качестве стабилизирующего пептида. КДНК IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 и IL-18 получали путем выделения общей РНК из лимфоцитов человека с помощью набора для выделения РНК (Invitron Biotechnology) и обратной транскрипции общей РНК при помощи обратной
20 транскриптазы (Invitrogen). Полученную в результате кДНК использовали в качестве матрицы и амплифицировали при помощи ПЦП с применением следующих специфических к каждому гену кДНК праймеров:

IL2-22-BamHI-F: ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (SEQ ID NO: 11)

IL2-153-Xho-R: CACTCTCGAGTCAAGTCAGTGTGAGAT (SEQ ID NO: 12)

25 IL12-p40-23-BamH: GTGGATCCATATGGGAAGTGAAGAAAGATG (SEQ ID NO: 13)

IL12-p40-328-CT-His: ATGGTGATGATGACTGCAGGGCACAGATGCCC (SEQ ID NO:

14)

IL12-p35-23-BamH: GTGGATCCAGAAACCTCCCCGTGGC (SEQ ID NO:15)

IL12-p35-219-CT-His: ATGGTGATGATGGGAAGCATTCAGATAGC (SEQ ID NO:16)

30 IL15-49-Nde: GAGTCAAGCATATGAAGTGGGTGAATGTAA (SEQ ID NO:17)

IL15-162-BamH-R: GTGGATCCAGAAGTGTGATGAAC (SEQ ID NO:18)

IL18-37-BamH: GTGGATCCTACTTTGGCAAGCTTG (SEQ ID NO:19)

IL18-193-EcoR1: AGACTGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTG (SEQ ID NO:20).

ФИГ.1 является схематическим изображением, демонстрирующим конструкторы
35 химерных продуктов SP с указанными цитокинами, в том числе IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 и IL-18. Как показано на этой фигуре, химерный продукт SP-hIL2 строили путем последовательного субклонирования генов, кодирующих амплифицированный с помощью ПЦП hIL2 и аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина, в вектор экспрессии pRSETA. Химерный продукт SP-hIL12p40 строили путем последовательного
40 субклонирования генов, кодирующих амплифицированный с помощью ПЦП hIL12p40 и аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина, в вектор экспрессии pVL1393. Химерный продукт SP-hIL12p35 строили путем последовательного субклонирования генов, кодирующих амплифицированный с помощью ПЦП hIL12p35 и аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина, в вектор экспрессии pVL1393. Химерный продукт hIL15-
45 SP hIL12p35 строили путем последовательного субклонирования генов, кодирующих амплифицированный с помощью ПЦП hIL15 и аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина, в вектор экспрессии pRSETA. Химерный продукт SP-hIL18 строили путем последовательного субклонирования генов, кодирующих амплифицированный с

помощью ПЦР ЫЫ8 и аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина, в вектор экспрессии pRSETA. Последовательности всех конструкторов подтверждали посредством секвенирования ДНК.

5 Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности химерного продукта SP-hIL2 изложены в SEQ ID NO:1 и 2, соответственно. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности химерного продукта SP-hIL12p40 изложены в SEQ ID NO:3 и 4, соответственно. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности химерного продукта SP-hIL12p35 изложены в SEQ ID NO:5 и 6, соответственно. Как
10 показано на ФИГ.1, последовательность с 6X His-меткой содержалась в каждом векторе с целью выделения и очистки химерного продукта SP-hIL12p40 и химерного продукта SP-hIL12p35, которые экспрессировались с помощью вирусов. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности химерного продукта hIL15-SP изложены в SEQ ID NO:7 и 8, соответственно. Также последовательности нуклеиновых
15 кислот и аминокислотные последовательности химерного продукта SP-hIL18 изложены в SEQ ID NO:9 и 10, соответственно.

Пример получения 2: Экспрессия и очистка рекомбинантного химерного белка SP

20 Построенный для экспрессии рекомбинантного белка SP-hIL2 вектор экспрессии трансформировали в BL21(DE3)RIPL Escherichia coli (Invitrogen) и инкубировали. Раствор культуры центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 минут с получением клеточного осадка. Клеточный осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7,4) и затем гомогенизировали при помощи разрушения ультразвуком. Экспрессированный в нерастворимой форме у E. coli химерный белок SP подвергали
25 процедуре рефолдинга и затем очищали при помощи ионообменной смолы.

30 Построенные для экспрессии рекомбинантного белка SP-hIL12 два вектора экспрессии трансфицировали в линии клеток насекомого, клетки sf21, с получением раствора вирусной культуры, соответственно. Два полученных в результате раствора вирусной культуры одновременно трансфицировали в линии клеток насекомых sf21 с получением гетеродимерного белка IL12p70, у которого IL12p40 связан к IL12p35, и который затем
35 очищали.

Построенный для экспрессии рекомбинантного белка hIL15-SP вектор экспрессии трансформировали в BL21(DE3)RIPL E. coli (Invitrogen) и затем инкубировали. Раствор культуры центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 минут с получением клеточного осадка. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS (pH 7,4) и затем
40 гомогенизировали при помощи разрушения ультразвуком. Экспрессированный в растворимой форме у E. coli химерный белок SP очищали при помощи ионообменной смолы.

Построенный для экспрессии рекомбинантного белка SP-hIL18 вектор экспрессии трансформировали в BL21(DE3)RIPL E. coli (Invitrogen) и затем инкубировали. Раствор культуры центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 минут с получением клеточного осадка. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS (pH 7,4) и затем
45 гомогенизировали при помощи разрушения ультразвуком. Экспрессированный в растворимой форме у E. coli химерный белок SP очищали при помощи ионообменной смолы.

Очищенный химерный белок SP (3 мкг) подвергали электрофорезу в 15% ДСН-ПААГ для верификации конечного очищенного белка (ФИГ.2; (a) белок SP-hIL2 (ATGen, кат. №ATGK04), (b) белок IL15-SP (ATGen, кат. №ATGK06) и (c) белок SP-IL18 (ATGen, кат. №ATGK07)).

Экспериментальный пример 1: Верификация разновидностей цитокинов, способных активировать НК-клетки в цельной крови

1 мл цельной крови от здорового человека и 1 мл среды RPMI1640 помещали в 24-луночный планшет для клеточной культуры, смешивали с 10 нг/мл каждого из рекомбинантных интерлейкинов IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18 человека и затем культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и измеряли при помощи способа ИФА по типу сэндвича количество интерферона- γ в супернатанте (ФИГ.3А). В результате, секретлируемые НК-клетками цитокины в образце крови здорового человека не были определены по причине их малого количества, но при обработке образца крови по меньшей мере одним из IL-2, IL-12, IL-15 и IL-18 уровень секретлируемых НК-клетками цитокинов в образец крови повышался. При обработке образца крови только стимулятором НК-клеток было видно, что уровень интерферона- γ в образце крови повышался, особенно у обработанных IL-2 и обработанных IL-12 групп (ФИГ.3А).

Также 1 мл цельной крови от здорового человека и 1 мл среды RPMI1640 помещали в 24-луночный планшет для клеточной культуры, обрабатывали различными комбинациями рекомбинантных интерлейкинов человека, как показано на ФИГ.3 В (10 нг/мл каждого), и культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и измеряли уровень интерферона- γ таким же способом, как описано выше. При обработке цельной крови различивши комбинациями стимуляторов НК-клеток было видно, что уровень интерферона- γ повышался, особенно в присутствии IL-2+IL-12 (ФИГ.3В).

Дополнительно, для измерения уровня интерферона- γ после обработки комбинацией IL-12 и IL-15 цельную кровь обрабатывали концентрацией стимулятора НК-клеток, как показано на ФИГ.3С, и культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и уровень интерферона- γ измеряли таким же способом, как описано выше.

Для измерения уровня интерферона- γ после обработки комбинацией IL-12 и IL-18 цельную кровь также обрабатывали концентрацией стимулятора НК-клеток, как показано на ФИГ.3D, и затем культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и уровень интерферона- γ измеряли таким же способом, как описано выше.

Экспериментальный пример 2: Верификация разновидностей цитокинов, секретлируемых искусственно активированными при помощи IL-2 НК-клетками

Образцы цельной крови забирали от 61 здорового человека и от 50 больных злокачественным заболеванием. 1 мл цельной крови и 1 мл среды RPMI1640 помещали в 24-луночный планшет для клеточной культуры, обрабатывали 10 нг/мл рекомбинантного интерлейкина SP IL-2 человека и затем культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и уровни интерферона- γ , TNF- α и MIP-1 β измеряли при помощи способа ИФА по типу сэндвича. В результате подтверждали, что интерферон- γ и TNF- α выделялся из цельной крови здорового человека в меньшем количестве, чем таковые у больных злокачественной опухолью, но MIP-1 β выделялся из образцов цельной крови здорового человека и больного злокачественной опухолью, как показано на ФИГ.4.

В случае применяемых для теста на заболевание реактивов для диагностики *in vitro* использовали ряд валидационных методик. В целом, в соответствии с настоящим изобретением использовали нормальный диапазон и анализ порогового значения. Нормальный диапазон представляет собой эталонный диапазон, который использовали

для измерения среднего значения и среднеквадратичного отклонения у каждой группы образцов, а анализ порогового значения представляет собой способ измерения клинической чувствительности и специфичности путем вычисления расчетной величины диагностического реактива *in vitro*. Клиническая чувствительность означает вероятность, признаваемую как демонстрирующую положительные результаты диагностического теста в случае, когда пациент страдает заболеванием, а клиническая специфичность означает вероятность, признаваемую как демонстрирующую отрицательные результаты диагностического теста в случае, когда пациент не страдает заболеванием.

Предположим, что если пороговое значение составляло более 10% и менее 10%, пороговое значение, соответственно, устанавливали для положительных и отрицательных значений. Затем, клиническую чувствительность и клиническую специфичность измеряли с помощью анализа порогового значения. Результаты приведены в таблице 1.

	IFN- γ	TNF- α	MIP-1 β
Клиническая чувствительность (%)	98,4	90,9	100
Клиническая специфичность (%)	98,0	69,0	50

Согласно результатам измерений в группах больных злокачественным заболеванием и здоровых людей IFN- γ характеризуется чувствительностью 98,4% и специфичностью 98%. Несмотря на то, что согласно результатам измерений TNF- α характеризуется чувствительностью 90,9% и специфичностью 69%, которые были ниже, чем у IFN- γ , разработанные на данный момент наборы для диагностики злокачественной опухоли характеризуются специфичностью максимум 20-30%. Таким образом, ожидается, что TNF- α , характеризующийся специфичностью приблизительно 70% или более, также может быть использован в качестве маркера для наборов для диагностики злокачественной опухоли с целью измерения активности НК-клеток.

Экспериментальный пример 3: Сравнение стабильностей SP IL-2 и IL-2

Для сравнения стабильностей SP IL-2 и IL-2 от двух людей забирали образцы цельной крови. 1 мл от каждого полученного образца цельной крови и 1 мл среды RPMI1640 помещали в 24-луночный планшет для клеточной культуры и затем добавляли SP IL-2 и IL-2, тщательно перемешали, а затем культивировали в течение 24 часов. После 24-часового культивирования забирали супернатант и уровни интерферона- γ измеряли с помощью способа ИФА по типу сэндвича. По результатам анализов активностей IL-2 и SP IL-2 было видно, что различие в активностях двух белков отсутствовало (ФИГ.5А). Однако, при обработке цельной крови SP IL-2, а не IL-2, в условиях культивирования цельной крови, соответственно, подтверждали, что НК-клетки активировались SP IL-2, таким образом повышая уровень интерферона- γ (ФИГ.5В). Это указывает на отсутствие различия в активностях двух белков, но стабильность IL-2 повышается в связи с применением SP.

Экспериментальный пример 4: Сравнение активности НК-клеток от здоровых людей и больных злокачественным заболеванием по отношению к условиям стимулирования НК-клеток

1 мл каждого из образцов цельной крови забирали от 20 здоровых людей и от 48 больных злокачественным заболеванием на терминальной стадии (стадия 3-4) и 1 мл среды RPMI1640 помещали в 24-луночный планшет для культивирования, каждый образец разделяли на две подгруппы и подгруппы обрабатывали SP IL-2 (10 нг/мл) (условие А) и SP IL-2 (5 нг/мл)+IL-12 (5 нг/мл) (условие В), соответственно, и затем культивировали в течение 24 часов. После культивирования забирали супернатант и

измеряли уровни интерферона- γ при помощи способа ИФА по типу сэндвича.

В результате было видно, что приблизительно 90% здоровых людей имели высокий уровень интерферона- γ , но большинство больных злокачественным заболеванием имели низкий уровень интерферона- γ в случае условия А, как показано на ФИГ.6. В случае условия В также было видно, что здоровые люди имели высокий уровень интерферона- γ , а большинство больных злокачественным заболеванием имели низкий уровень интерферона- γ . Однако высокий уровень интерферона- γ был выше у больных злокачественным заболеванием в случае условия В, по сравнению со случаем условия А. При обработке образца цельной крови только SP IL-2 специфически активировались лишь НК-клетки (см. следующий экспериментальный пример 5 и ФИГ.7), но НК-клетки были способны активироваться вместе с Т-клетками при обработке образца цельной крови комбинацией SP IL-2 и IL-12 и, следовательно, уровень интерферона- γ можно было повысить за счет активации Т-клеток. Поэтому считают, что высокий уровень интерферона- γ можно наблюдать у некоторых больных злокачественным заболеванием, у которых сохраняется активность Т-клеток. Если больные злокачественным заболеванием имеют низкий уровень интерферона- γ даже при обработке в соответствии с условием В, то можно сделать вывод, что у больных злокачественным заболеванием были снижены противораковый иммунитет НК-клеток и компоненты общего системного иммунитета. Полагают, что это можно использовать в качестве важного маркера для определения и прогноза прогрессирования злокачественной опухоли.

Экспериментальный пример 5: Сравнение активности НК-клеток от здоровых людей и больного злокачественным заболеванием при воздействии IL2 в зависимости от типа образцов крови

Для определения различия способности секретировать интерферон- γ при воздействии IL2 в зависимости от типа образцов крови от здоровых людей осуществляли следующий эксперимент. Измеряли (а) способность секретировать интерферон- γ у НК-клеток на 1 нг/мл IL2 от Т-клеток, (б) способность секретировать интерферон- γ у НК-клеток на 1 нг/мл IL2 от НК-клеток, (с) способность секретировать интерферон- γ у НК-клеток на 1 нг/мл IL2 из цельной крови и (д) способность секретировать интерферон- γ у НК-клеток в зависимости от концентрации IL2 от МКПК. Результаты показаны на ФИГ.7.

Интерферон- γ измеряли таким же способом, как описано выше. В результате, поскольку изменилось количество интерферона- γ , секретлируемого в результате активации IL2 Т-клеток, но оно не сильно отличалось от количества интерферона- γ у не обработанной группы, то Т-клетки не были пригодны для применения в виде образца крови. У цельной крови, МКПК и НК-клетках есть значимое различие в количестве интерферона- γ по сравнению с количеством интерферона- γ у не обработанной группы. Поэтому, цельную кровь, МКПК и НК-клетки оценивали как пригодные образцы крови для применения в способе и наборе в соответствии с настоящим изобретением.

Экспериментальный пример 6: Сравнение активности НК-клеток от здоровых людей при воздействии ЛПС

В качестве другого примера средства, которое служит для стимуляции НК-клеток в образце крови и искусственной активации НК-клеток к выработке интерферона- γ , для измерения количества интерферона- γ из цельной крови человека использовали ЛПС. Как показано на ФИГ.8, выявили, что секрецию интерферона- γ индуцировали при помощи 50 нг/мл ЛПС, что указывает на то, что НК-клетки могут быть искусственно активированы к выработке интерферона- γ даже при стимуляции НК-клеток неспецифическим агонистом, таким как ЛПС.

Экспериментальный пример 7: Стимуляция НК-клеток при помощи hIL12 и hIL15,

слитых со стабилизирующим пептидом

В качестве пробирки для инкубирования NK-клеток приобретали и использовали содержащую антикоагулянт натриевую соль гепарина пробирку (BD) для предотвращения свертывания крови. Забирали 5 мл цельной крови и помещали в содержащую антикоагулянт (натриевую соль гепарина) пробирку. 1 мл полученной 5 цельной крови смешали со средой RPMI1640 и активаторами NK-клеток, туда же добавляли SP-hIL2/hIL12. Полученную в результате смесь инкубировали при 37°C в течение 16-24 часов. Стимуляцию NK-клеток в цельной крови при помощи слитого со стабилизирующим пептидом SP hIL2 и hIL12 определили путем измерения количества 10 интерферона- γ в крови, инкубированной в соответствии с описанным выше в экспериментальном примере способом.

При этом измеряли количество секретированного интерферона- γ в зависимости от условий культивирования цельной крови. Как показано на ФИГ.9, было выявлено, что способность секретировать интерферон- γ у NK-клеток повышалась при инкубации NK-клеток в PBS с добавлением белка-носителя, такого бычий сывороточный альбумин, 15 по сравнению с тем, когда NK-клетки инкубировали в PBS.

Экспериментальный пример 8: Отличие секреции интерферона- γ в зависимости от стадии прогрессирования злокачественной опухоли

Для определения количества секретированного интерферона- γ в зависимости от 20 стадии прогрессирования злокачественной опухоли цельную кровь от больной злокачественной опухолью пациентки 1 (пациентка полностью выздоровела от злокачественной опухоли молочной железы), больного злокачественной опухолью пациента 2 (больного подозрением на заболевание злокачественной опухолью мозга) и здорового человека инкубировали в течение 24 часов в среде RPMI1640 с добавлением 25 100 нг/мл IL12 и 1000 нг/мл IL15 и измеряли описанным выше способом количества секретированного интерферона- γ . Также, цельную кровь подвергли проточной цитометрии.

В результате, были подтверждены способности секретировать интерферон- γ , по порядку, у здорового человека, больной злокачественной опухолью пациентки 1 и 30 больной злокачественной опухолью пациента 2, как показано на ФИГ.10. Таким образом, было подтверждено, что количества секретированного интерферона- γ в зависимости от стадии прогрессирования злокачественной опухоли отличались. На основании этих фактов, было видно, что способ в соответствии с настоящим изобретением может быть использован для измерения количества секретируемого NK-клетками интерферона- γ в образце крови, таким образом прогнозируя вероятность 35 возникновения и стадию прогрессирования злокачественной опухоли или прогнозируя рецидив злокачественной опухоли.

Экспериментальный пример 9: Количественное определение интерферона- γ , выработанного в результате стимуляции NK-клеток

В качестве пробирки для инкубирования NK-клеток приобрели и использовали содержащую антикоагулянт натриевую соль гепарина пробирку (BD) для предотвращения свертывания крови. От восьми здоровых людей забирали по 5 мл 40 цельной крови и помещали в содержащую антикоагулянт (натриевую соль гепарина) пробирку. 1 мл полученной цельной крови смешали со средой RPMI1640, туда же добавляли SP-hIL12/hIL15-SP, связанный со стабилизирующим пептидом. Полученную 45 в результате смесь инкубировали при 37°C в течение 16-24 часов.

Инкубированную при 37°C цельную кровь от восьми здоровых людей центрифугировали при 1500-2000 g с получением сыворотки в виде супернатанта. Затем

забирали 150-200 мкл сыворотки и провели ИФА на интерферон- γ . Первичное антитело с 0,05% твина (моноклональное антитело к интерферону- γ человека, ATGen, кат. №ATGK02) развели буфером для сенсбилизации поверхностей (0,1 карбонат натрия, рН 9,5) в соотношении 1:1000. Разбавленное первичное антитело разделяли на 96-луночном титровальном микропланшете для ИФА (Nunc Maxisorp; NUNC, Нэпервилл, Иллинойс) с дозой по 100 мкл/лунка и оставили при температуре 4°C на 16-18 часов. После этого раствор удалили из планшета и промыли планшет промывающим раствором (содержащим 0,05% твина 20 PBS) с дозой по 400 мкл/лунка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Затем, PBS содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) разделили с дозой по 300 мкл/лунка и выдержали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого раствор удалили из планшета и планшет промыли PBST (содержащим 0,05% твина 20 раствором PBS) с дозой по 400 мкл/лунка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Покрытый первичным антителом 96-луночный титровальный микропланшет для ИФА герметично закрыли и хранили при 4°C до применения.

Стандартный раствор интерферона- γ (PBS, содержащий 200 нг рекомбинантного интерферона- γ человека (ATGen, кат. №IFG4001) и 0,05% Proclin 300) развели и разделяли с дозой по 100 мкл/лунка в покрытом первичным антителом 96-луночном титровальном микропланшете для ИФА, и полученную на экспериментальном этапе сыворотку пациента разделили с дозой 100 мкл/лунка, и затем выдержали при комнатной температуре в течение 2 часов.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Холостой	Холостой	НИ									
B	Холостой	Холостой	НИ									
C	S1	S1	НИ									
D	S2	S2	НИ									
E	S3	S3	НИ									
F	S4	S4	НИ									
G	S5	S5	НИ									
H	S6	S6	НИ									

Холостой: только буфер, S1-S6: стандарт в серийных разведениях, и НИ (неизвестно): сыворотка пациента

Спустя 2 часа раствор из 96-луночного титровального микропланшета для ИФА удалили и промыли планшет промывающим раствором с дозой по 400 мкл/лунка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Затем, вторичное антитело (биотинилированное моноклональное антитело к интерферону- γ человека (ATGen кат. №ATGK 03)) развели раствором для разведения в соотношении 1:500, разделяли с дозой по 100 мкл/лунка и затем выдержали при комнатной температуре в течение 1 часа. После этого раствор удалили из планшета и планшет промыли три раза промывающим раствором с дозой по 400 мкл/лунка. Раствор конъюгированного с HRP стрептавидина (Thermo Scientific, кат. №21130) развели раствором для разведения в соотношении 1:3000, разделяли с дозой по 100 мкл/лунка и затем выдержали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем, разведенный раствор конъюгированного с HRP стрептавидина разделяли в планшете для ИФА и инкубировали в течение 1 часа. После одночасового инкубирования раствор из 96-луночного титровального микропланшета для ИФА удалили и планшет промыли три раза промывающим раствором с дозой по 400 мкл/лунка.

Для приготовления раствора субстрата 1 мг тетраметилбензида (ТМБ) растворили в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) и полученную в результате смесь развели 9 мл

0,05 М фосфат-цитратного буфера. Затем, раствор субстрата разделяли по планшету с дозой по 100 мкл/лунка и выдержали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Раствор для остановки реакции (2 н. раствор серной кислоты в растворе для разведения) разделяли с дозой по 100 мкл/лунка для остановки реакции и измеряли полученный в результате реакционный раствор при 450 нм с помощью ИФА-ридера.

Способности секретировать интерферон- γ у НК-клеток, измеренные с применением цельной крови от восьми здоровых людей, показаны на ФИГ.11. Эти результаты указывают на то, что при стимуляции цельной крови цитокином присутствующие в крови иммунные клетки эффективно активируются с индукцией секреции интерферона- γ .

Кроме того, после стимуляции цельной крови от восьми здоровых людей цитокином цельную кровь подвергли проточной цитометрии. Полученные результаты отображены на ФИГ.12. Исходя из этих результатов, выявили, что НК-клетки проявляли цитотоксичность, поскольку НК-клетки были активированы в результате стимуляции цельной крови. CD56 был маркером НК-клеток, а CD107a был маркером, указывающим на то, что НК-клетки секретировали цитотоксичные гранулы. Поскольку результаты по секреции интерферона- γ на ФИГ.11 значимо коррелировали с результатами по производимой НК-клетками цитотоксичности на ФИГ.12, было видно, что способность секретировать интерферон- γ у НК-клеток в результате стимуляции цельной крови опосредованно выражает цитотоксичность НК-клеток.

В соответствии с настоящим изобретением вероятность возникновения и рецидив злокачественной опухоли могут быть диагностированы посредством отслеживания изменений иммунной системы *in vivo* и измерения активности НК-клеток в крови, например у субъекта, больного злокачественной опухолью, или с подозрением на злокачественную опухоль. Настоящее изобретение может, таким образом, быть пригодным для прогнозирования вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли с применением образца крови от субъекта.

Несмотря на то что в настоящем документе были раскрыты иллюстративные варианты осуществления, следует понимать, что могут быть возможны другие варианты. Такие варианты не будут считаться отклонением от объема иллюстративных вариантов осуществления настоящей заявки, и все подобного рода модификации, как это будет очевидно для рядового специалиста в данной области, подразумеваются как включенные в объем приведенной далее формулы изобретения.

Все упомянутые в настоящем документе документы включены в него при помощи ссылок.

(57) Формула изобретения

1. Способ измерения активности натуральных клеток-киллеров (НК-клеток), включающий:

стимулирование НК-клеток в образце цельной крови посредством инкубирования образца цельной крови со средством, включающим по меньшей мере один стимулирующий цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 15 и интерлейкина 18, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретлируемых НК-клетками цитокинов; активируя НК-клетки к секреции, секретлируемых НК-клетками цитокинов

и измерение количества секретлируемых НК-клетками цитокинов, секретированных в образце цельной крови.

2. Способ по п. 1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством

инкубирования образца крови с интерлейкином 2.

3. Способ по п. 1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца крови с интерлейкином 2 и интерлейкином 12.

4. Способ по п. 1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца крови с интерлейкином 15 и интерлейкином 12.

5. Способ по п. 1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца крови с интерлейкином 18 и интерлейкином 12.

6. Способ по п. 1, где секретируемые НК-клетками цитокины выбирают из группы, состоящей из интерферона-гамма (IFN- γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и макрофагального белка воспаления 1 β (MIP-1 β).

7. Способ по п. 1, где секретируемым НК-клетками цитокином является интерферон-гамма (IFN- γ).

8. Способ по п. 1, где секретируемым НК-клетками цитокином является фактор некроза опухоли альфа (TNF- α).

9. Способ по п. 1, где макрофагальный белок воспаления-1 β (MIP-1 β) применяют в качестве контрольной группы для сравнения активации НК-клеток с активацией у здорового человека.

10. Способ по п. 1, где измерение количества секретируемых НК-клетками цитокинов осуществляют посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) или другого иммуноанализа.

11. Способ по п. 1, где по меньшей мере один стимулирующий цитокин находится в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом.

12. Способ по п. 11, где стабилизирующий пептид представляет собой пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов.

13. Способ по п. 12, где стабилизирующий пептид содержит аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO: 23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO: 24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO: 27), аминокислотные остатки 1-127 γ -синуклеина (SEQ ID NO: 28), или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 29).

14. Способ по п. 1, где этап стимулирования НК-клеток в образце цельной крови, таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов, осуществляют в растворе (лиофилизированном или жидком), содержащем белок-носитель.

15. Способ по любому из пп. 1-14 для определения вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

16. Способ по п. 15, где понижение количества секретируемых НК-клетками цитокинов у субъекта по сравнению с уровнями у здоровых людей является показателем вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

17. Способ по п. 1, где, по меньшей мере, один стимулирующий цитокин находится в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом, где химерный белок включает аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью или по меньшей мере 90% идентичностью или по меньшей мере 95% идентичностью или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 10.

18. Набор для измерения активности натуральных клеток-киллеров (НК-клеток), содержащий:

средство для стимуляции НК-клеток в образце цельной крови посредством

инкубирования образца цельной крови со средством, таким образом искусственно активируя NK-клетки к выработке секретируемых NK-клетками цитокинов, которые секретируются в образце цельной крови для измерения,

5 при этом средство является или содержит по меньшей мере один стимулирующий цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 15 и интерлейкина 18 и по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, состоящей из антитела к IFN- γ , антитела к TNF- α и антитела к MIP-1 β

19. Набор по п. 18, в котором секретируемым NK-клетками цитокином является интерферон-гамма (IFN- γ).

10 20. Набор по п. 18, в котором секретируемым NK-клетками цитокином является фактор некроза опухоли альфа (TNF- α).

21. Набор по п. 18, в котором секретируемым NK-клетками цитокином является макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β).

15 22. Набор по п. 18, при этом указанный набор предназначен для определения вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

23. Набор по п. 22, дополнительно содержащий инструкции для сравнения количества секретируемых NK-клетками цитокинов у субъекта с уровнями у здоровых людей, при этом понижение уровня секретируемых NK-клетками цитокинов у субъекта является показателем вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

20 24. Набор для измерения активности натуральных клеток-киллеров (NK-клеток), содержащий:

средство для стимуляции NK-клеток в образце цельной крови посредством инкубирования образца цельной крови со средством, таким образом искусственно активируя NK-клетки к выработке секретируемых NK-клетками цитокинов, которые секретируются в образце цельной крови для измерения,

25 при этом средство является или содержит по меньшей мере один стимулирующий цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 15 и интерлейкина 18 и

30 пробирку для инкубирования образца цельной крови со средством, содержащую антикоагулянт.

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> АТГен Ко Лтд.

<120> СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И НАБОР ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ
ПУТЕМ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК

<130> 08921046WO

<150> KR 2011-0012983

<151> 2011-02-14

<160> 29

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 474

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерная кодирующая последовательность SP-hIL2

<400> 1

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatcccctac tcaagtctt acaagaanaa cacagctaca actggagcat 120

ttactgctgg atttacagat gattttgaat ggaattaata attacaagaa tcccaaactc 180

accgagatgc tcacatttaa gttttacatg cccaagaagg ccacagaact gaaacatctt 240

cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaagcaaa 300

aactttcact taagaccag ggacttaatc agcaatatca acgtaatagt tctggaacta 360

aagggatctg aaacaacatt catgtgtgaa tatgctgatg agacagcaac cattgtagaa 420

tttctgaaca gatggattac cttttgcaa agcatcatct caaactgac ttga 474

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерный полипептид SP-hIL2

<400> 2

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys
 20 25 30

Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile
 35 40 45

Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
 50 55 60

Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
 65 70 75 80

Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu
 85 90 95

Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn
 100 105 110

Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
 115 120 125

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
 130 135 140

Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 145 150 155

<210> 3

<211> 1014

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерная кодирующая последовательность SP-hIL12p40

<400> 3

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatccatag ggaactgaag aaagatgttt atgtcgtaga attggattgg 120
 tatccggatg cccctggaga aatggtggtc ctcacctgtg acaccctga agaagatggt 180
 atcacctgga ccttggacca gagcagtgag gtcttaggct ctggcaaac cctgaccatc 240
 caagtcaaa agtttggaga tgctggccag tacacctgtc acaaaggagg cgaggttcta 300
 agccattcgc tctctgtct tcacaaaaag gaagatggaa ttggtccac tgatattta 360
 aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc ttctaagat gcgaggccaa gaattattct 420
 ggacgtttca cctgctggtg gctgacgaca atcagtactg attgacatt cagtgtcaaa 480
 agcagcagag gctcttctga cccccaaggg gtgacgtgcg gagctgtac actctctgca 540
 gagagagtca gaggggacaa caaggagtat gagtactcag tggagtgccca ggaggacagt 600
 gcctgccag ctgctgagga gactctgccc attgaggta tggaggatgc cgttcacaag 660
 ctcaagtatg aaaactacac cagcagcttc ttcacaggg acatcatcaa acctgacca 720
 cccaagaact tgcagctgaa gccattaaag aattctcggc aggtggaggt cagctgggag 780
 tacctgaca cctggagtac tccacattcc tacttctccc tgacattctg cgttcaggtc 840
 cagggcaaga gcaagagaga aaagaaagat agagtcttca cggacaagac ctcagccacg 900
 gtcatctgcc gcaaaaatgc cagcattagc gtgcgggccc aggaccgcta ctatagctca 960
 tcttggagcg aatgggcatc tgtgccctgc agtcatcacc accatcacca ctga 1014

<210> 4
 <211> 337
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> химерный полипептид SP-hIL12p40

<400> 4

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp
 20 25 30

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met

4

35 40 45

Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr
 50 55 60

Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly
 85 90 95

Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp
 100 105 110

Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr
 130 135 140

Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys
 145 150 155 160

Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala
 165 170 175

Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr
 180 185 190

Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser
 195 200 205

Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu
 210 215 220

Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu

5

245 250 255

Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe
260 265 270

Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys
275 280 285

Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg
290 295 300

Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser
305 310 315 320

Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser His His His His His
325 330 335

His

<210> 5

<211> 687

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерная кодирующая последовательность SP-hIL12p35

<400> 5

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cctctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttcccatgc 120

cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa 180

actctagaat ttacccttg cacttctgaa gagattgac atgaagatat cacaaaagat 240

aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggaattaa ccaagaatga aagctgtctt 300

aactcaagag aaacttcatt taccacaac ggtagtggcc tggcctccag aaagacctet 360

tttatgatgg ccctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatgta ccaggtggag 420

ttcaagacca tgaatgcaaa gcttctgatg gaccctaaga ggcaaatctt tctagatcaa 480

6

aacatgctgg cagttattga tgagctgatg caggccctga atttcaacag tgagactgtg 540
 ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat tttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata 600
 ctcttcgatg ctttcagaat tcgggcagtg actattgata gagtgatgag ctatctgaat 660
 gcttcccatc atcacatca ccaactga 687

<210> 6
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> химерный полипептид SP-hIL12p35

<400> 6

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr
 20 25 30

Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu
 35 40 45

Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe
 50 55 60

Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp
 65 70 75 80

Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn
 85 90 95

Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser
 100 105 110

Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser
 115 120 125

Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met

7

130 135 140

Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln
145 150 155 160

Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn
165 170 175

Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr
180 185 190

Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg
195 200 205

Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser His His
210 215 220

His His His His
225

<210> 7

<211> 420

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерная кодирующая последовательность hIL15-SP

<400> 7

atgaactggg tgaatgtaat aagtgattg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 60

catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 120

atgaagtgct ttctcttga gttacaagt attcacttg agtccggaga tgcaagtatt 180

catgatacag tagaaaaatc gatcacccta gcaacaaca gttgtcttc taatgggaat 240

gtaacagaat ctggatgcaa agaattgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt 300

ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca ctctggatc cgtacctgac 360

aatgaggctt atgaaatgcc ttctgaggaa gggtatcaag actacgaacc tgaagcctaa 420

<210> 8

8

<211> 139

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерный полипептид hIL15-SP

<400> 8

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110

Asn Thr Ser Gly Ser Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser
 115 120 125

Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135

<210> 9

<211> 549

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> химерная кодирующая последовательность SP-hIL18

<400> 9
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60
cctgaagccg gatcctactt tggcaagctt gaatctaaat taccagtcac aagaaatttg 120
aatgaccaag ttctcttcat tgaccaagga aatcggcctc tatttgaaga tatgactgat 180
tctgactgta gagataatgc accccggacc atatttatta taagtatgta taaagatagc 240
cagcctagag gtatggctgt aactatctct gtgaagtgtg agaaaatttc aactctctcc 300
tgtgagaaca aaattatttc cttaaggaa atgaatcctc ctgataacat caaggataca 360
aaaagtgaca tcatattctt tcagagaagt gtcccaggac atgataataa gatgcaattt 420
gaatcttcat catacgaagg atactttcta gcttgtgaaa aagagagaga cctttttaa 480
ctcatttga aaaaagagga tgaattgggg gatagatcta taatgttcac tgttcaaac 540
gaagactag 549

<210> 10
<211> 182
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> химерный полипептид SP-hIL18

<400> 10

Met Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr
1 5 10 15

Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala Gly Ser Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser
20 25 30

Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp
35 40 45

Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg
50 55 60

Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser
65 70 75 80

10

Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile
85 90 95

Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn
100 105 110

Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln
115 120 125

Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
130 135 140

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys
145 150 155 160

Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe
165 170 175

Thr Val Gln Asn Glu Asp
180

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> прямой праймер IL2-22-BamH1

<400> 11
acaggatccc ctacttcaag ttct 24

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> обратный праймер IL2-153-Xho

<400> 12
cactctcgag tcaagtcagt gttgagat 28

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> прямой праймер IL12-p40-23-BamH1

<400> 13
 gtggatccat atgggaactg aagaagatg 30

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> обратный праймер IL12-p40-328-CT-His

<400> 14
 atggtgatga tgactgcagg gcacagatgc cc 32

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> прямой праймер IL12-p35-23-BamH1

<400> 15
 gtggatccag aaacctccc gtggc 25

<210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> обратный праймер IL12-p35-219-CT-His

<400> 16
 atggtgatga tgggaagcat tcagatagc 29

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA

12

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой праймер IL15-49-Nde

<400> 17

gagtcaagca tatgaactgg gtgaatgtaa

30

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> обратный праймер IL15-162-BamH1

<400> 18

gtggatccag aagtgttgat гаас

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой праймер IL18-37-BamH1

<400> 19

gtggatccta ctttgcaag ctg

24

<210> 20

<211> 27

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> прямой праймер IL18-193-EcoR1

<400> 20

agactggaat tcctagtctt cgttttg

27

<210> 21

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> альфа-синуклеин человека

<400> 21

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45

Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60

Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80

Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> альфа-синуклеин человека / остатки 103-115 C-концевого
 кислого хвостового домена

<400> 22

14

Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp
 1 5 10

<210> 23
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> альфа-синуклеин человека / остатки 114-126 С-концевого
 кислого хвостового домена

<400> 23

Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp Met Pro Val Asp
 1 5 10 15

Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
 20

<210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>
 <223> альфа-синуклеин человека / остатки 119-140 С-концевого
 кислого хвостового домена

<400> 24

Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln
 1 5 10 15

Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 20

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> альфа-синуклеин человека / остатки 130-140 С-концевого
 кислого хвостового домена

<400> 25

Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 1 5 10

<210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> бета-синуклеин человека

<400> 26

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
 20 25 30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
 35 40 45

Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
 50 55 60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
 85 90 95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
 100 105 110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
 115 120 125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala

130

<210> 27

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> бета-синуклеин человека / остатки 85-134 С-концевого
кислого хвостового домена

<400> 27

Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln
1 5 10 15Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met Glu Pro Glu Gly
20 25 30Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln Glu Tyr Glu Pro
35 40 45Glu Ala
50

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> гамма-синуклеин человека (синоретин)

<400> 28

Met Asp Val Phe Lys Lys Gly Phe Ser Ile Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15Gly Ala Val Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
20 25 30Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
35 40 45

Val Gln Ser Val Thr Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Asn
 50 55 60

Ala Val Ser Glu Ala Val Val Ser Ser Val Asn Thr Val Ala Thr Lys
 65 70 75 80

Thr Val Glu Glu Ala Glu Asn Ile Ala Val Thr Ser Gly Val Val Arg
 85 90 95

Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala Ser
 100 105 110

Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
 115 120 125

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> гамма-синуклеин человека (синоретин) / остатки 96-127 C-концевого
 кислого хвостового домена

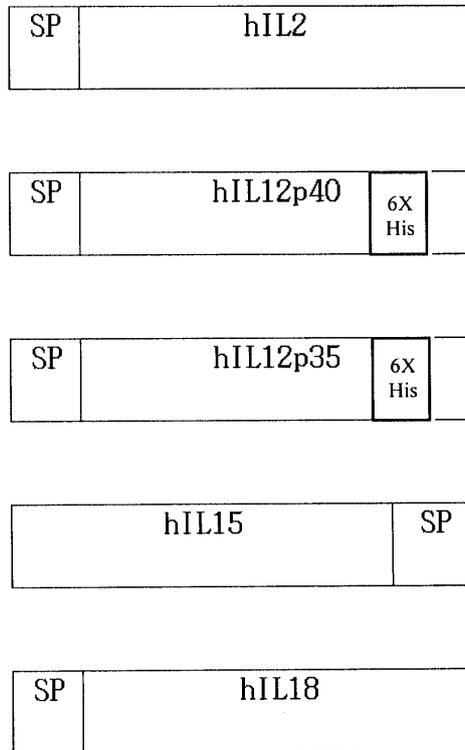
<400> 29

Arg Lys Glu Asp Leu Arg Pro Ser Ala Pro Gln Gln Glu Gly Glu Ala
 1 5 10 15

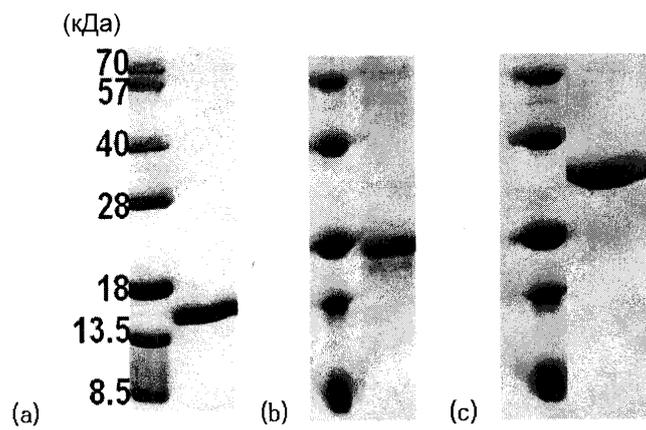
Ser Lys Glu Lys Glu Glu Val Ala Glu Glu Ala Gln Ser Gly Gly Asp
 20 25 30

1/9

Фиг. 1

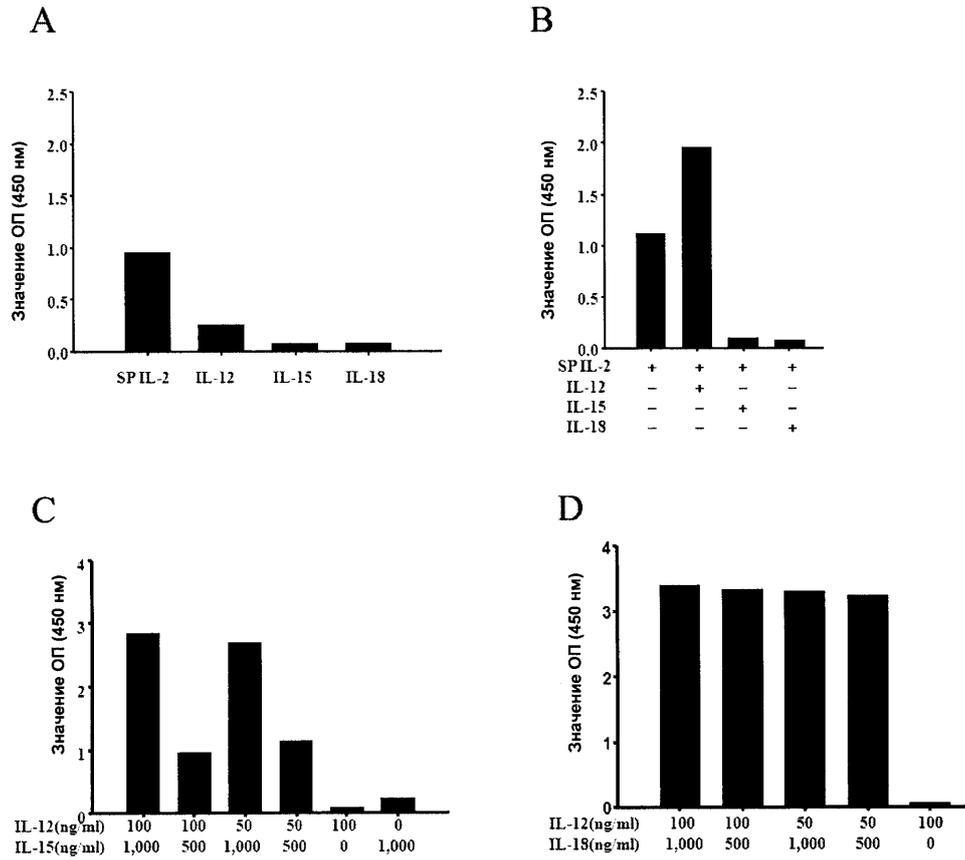


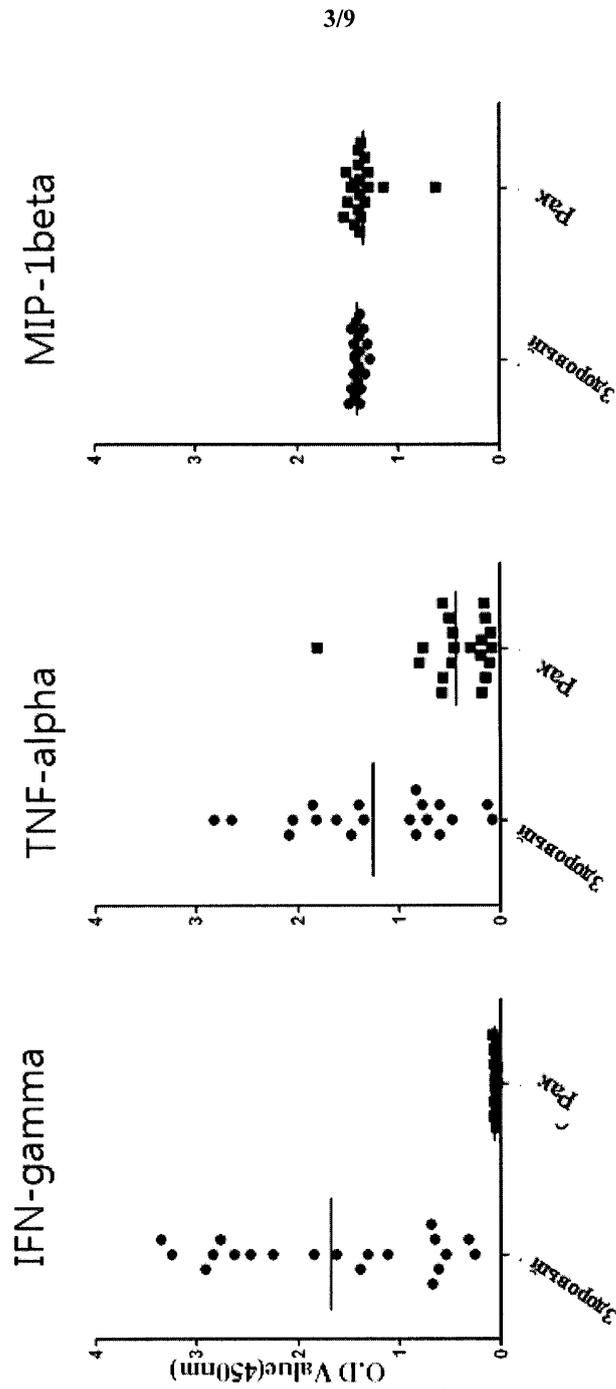
Фиг. 2



2/9

Фиг. 3





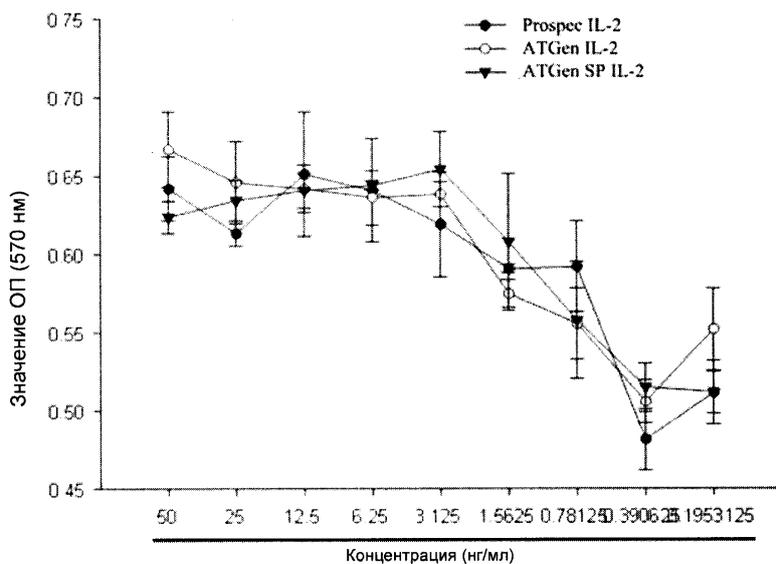
Фиг. 4

4/9

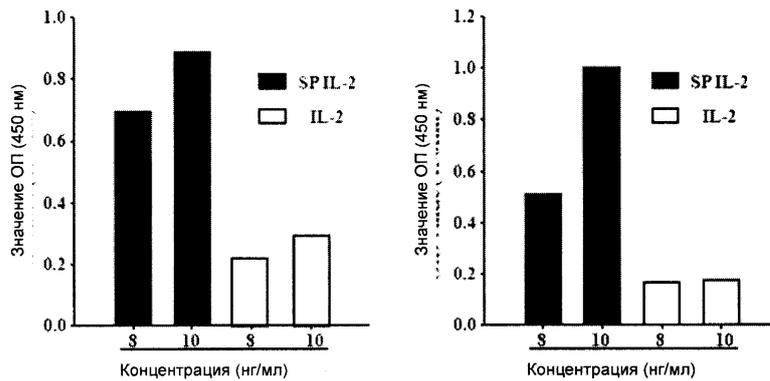
Значение ОП (450 нм)

Фиг. 5

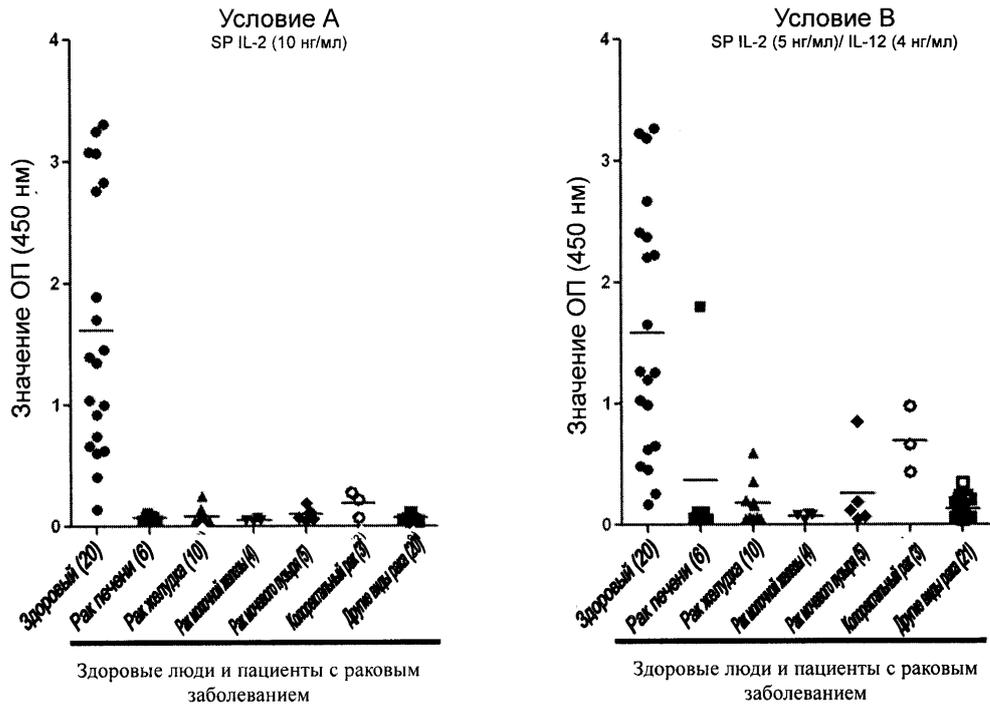
А



В

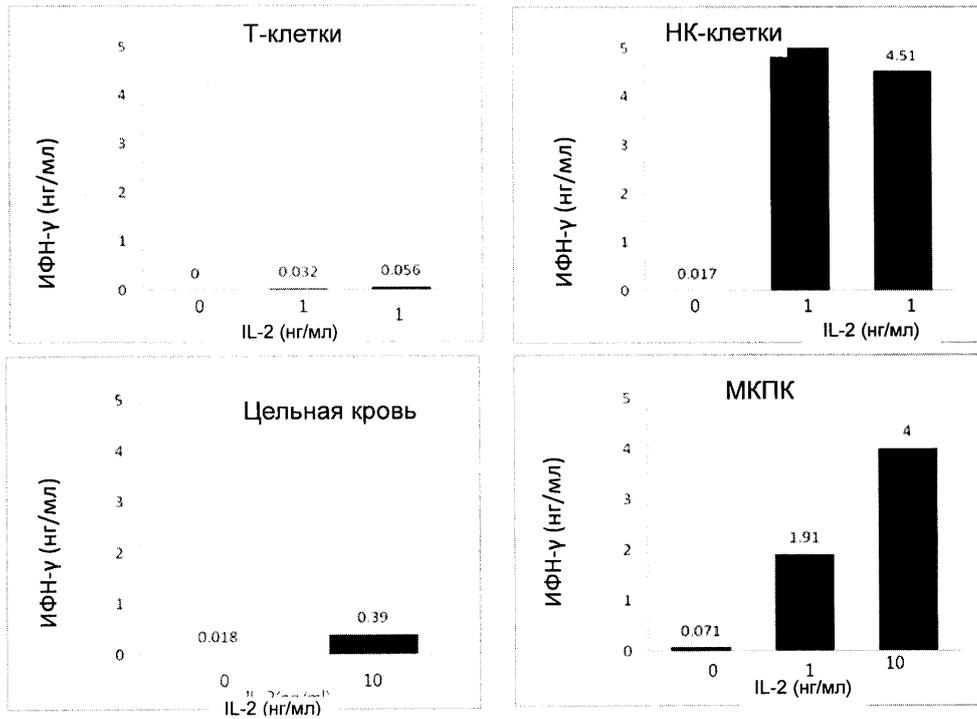


Фиг. 6



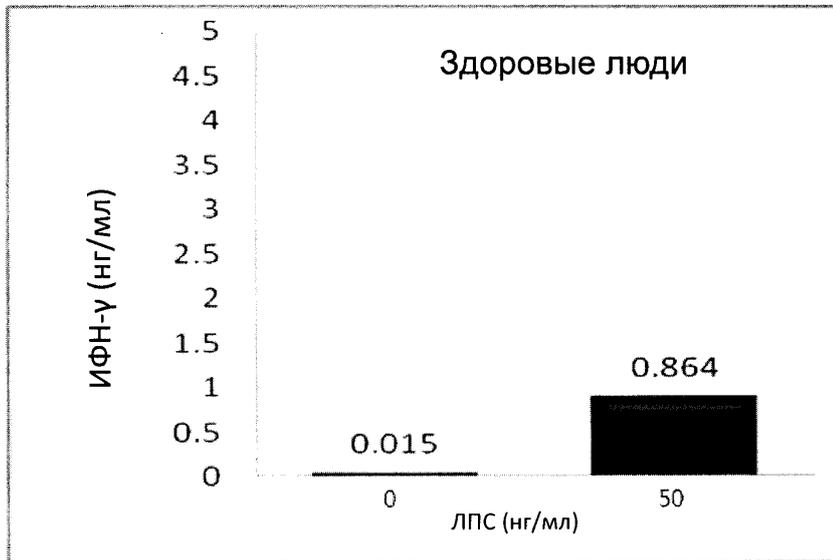
6/9

Фиг. 7

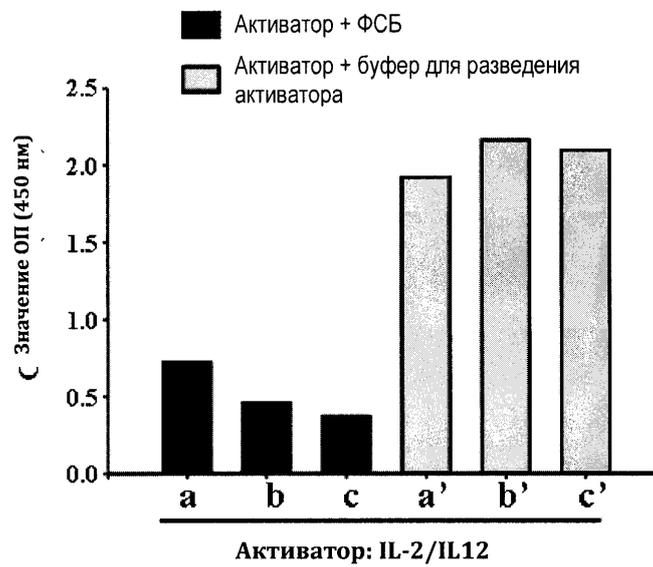


7/9

Фиг. 8

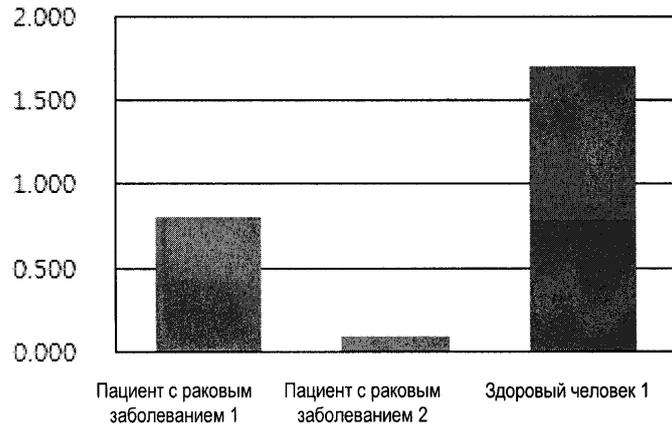


Фиг. 9

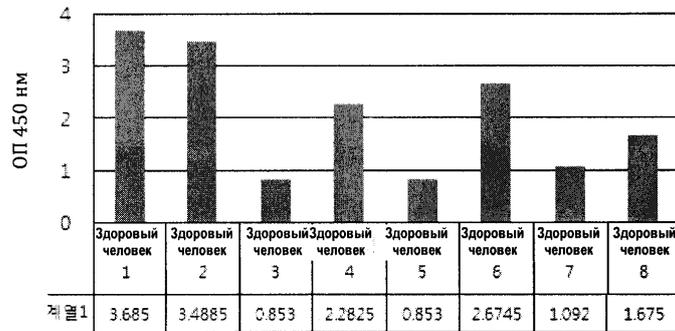


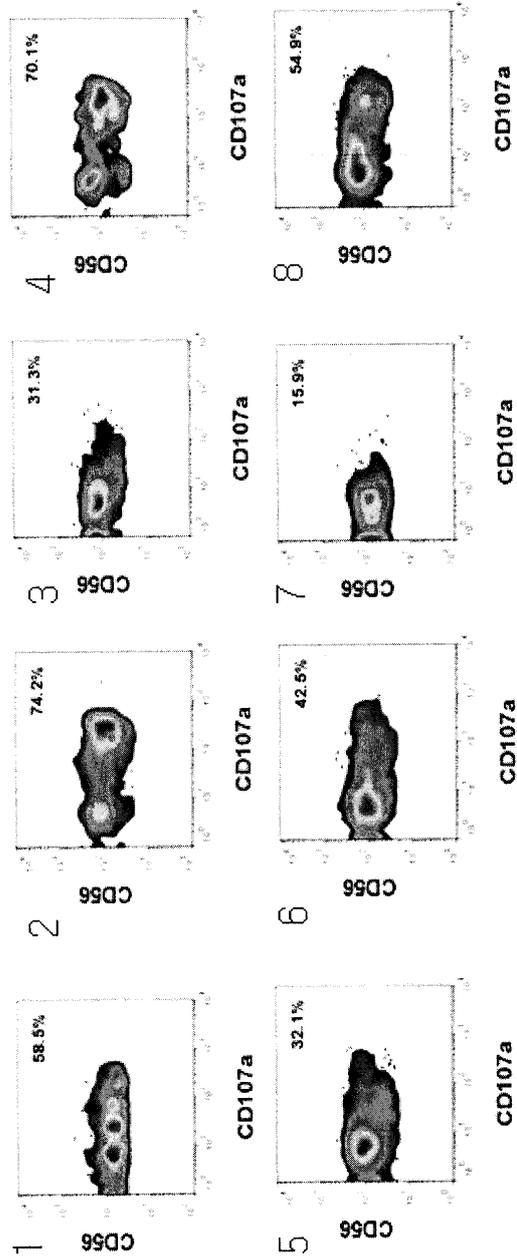
8/9

Фиг. 10



Фиг. 11





Фиг. 12