



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **83989** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 5/107 (2008.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВИДІЛЕНИЙ ПЕПТИД, ЯКИЙ СТИМУЛЮЄ ПРОТИПУХЛИННУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЙОГО ОСНОВІ ТА ЇЇ ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) 2004021049

(22) 11.07.2002

(24) 10.09.2008

(86) PCT/GB02/03203, 11.07.2002

(31) 09/904,492

(32) 13.07.2001

(33) US

(46) 10.09.2008, Бюл.№ 17, 2008 р.

(72) ВОНГ ВЕЙ МІНГ, ЛАМ КОНГ

(73) СІ-ЕМ-ЕС ПЕПТИДЕС ПАТЕНТ ХОЛДІНГ
КОМПАНІ ЛІМІТЕД

(56) WO A 9618646, 20.06.1996.

US A 5556744, 17.09.1996.

WO A 9109613, 11.07.1991.

FR A1 2794370, 08.12.2000.

FOGACA E.A.: "Antimicrobial activity of bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus micropus*" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 36, 1999, pages 25330-25334.

KARELIN A A ET AL: "PROTEOLYTIC DEGRADATION OF HEMOGLOBIN IN ERYTHROCYTES LEADS TO BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES" PEPTIDES, ELMSFORD, US, vol. 16, no. 4, 1995, pages 693-697.

SCHALLY E.A.: "Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the alpha-chain of porcine hemoglobin" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 82, no. 2, 1978, pages 582-588.

CHANG R C C ET AL: "ISOLATION AND STRUCTURE OF SEVERAL PEPTIDES FROM PORCINE HYPOTHALAMI" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 625, 1980, pages 266-273.

KARELIN A A ET AL: "[Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes results in formation of biologically active peptides]" BIOORGANICHESKAYA KHIMIYA RUSSIA APR 1998, vol. 24, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 271-281.

PATI E.A.: ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 1, 1995, pages 75-84.

LADRAM ET AL: "Characterization of receptors for thyrotropin-releasing hormone-receptors potentiating peptide on rat anterior pituitary membranes" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 267, no. 36, 25 December 1997 (1997-12-25), pages 25697-26702.

SQUIRE E.A.: "Leucine aminopeptidase-like activity in *Aplysia* hemolymph rapidly degrades biologically active alpha-bag cell peptide fragments" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 33, 25 November 1991 (1991-11-25), pages 22355-22363.

FURKA A ET AL: "STRING SYNTHESIS A SPATIALLY ADDRESSABLE SPLIT PROCEDURE" JOURNAL OF COMBINATORIAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 2, no. 3, 19 May 2000 (2000-05-19), pages 220-223.

BULANT M ET AL: "PROCESSING OF THYROTROPIN-RELEASING HORMONE PROHORMONE(PRO-TRH) GENERATES A BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE, PREPRO-TRH-(160-169), WHICH REGULATES TRH-INDUCED THYROTROPIN SECRETION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 87, no. 12, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 4439-4443.

WO A1 9812219, 26.03.1998.

WO A1 0063233, 26.10.2000.

WO A1 9735602, 02.10.1997

US B 5861483, 19.01.1999.

(57) 1. Виділений пептид, який стимулює протипухлинну імунну відповідь, що має амінокислотну послідовність SEQ ID No: 16.

2. Пептид за п. 1, де вказана відповідь відбувається за рахунок модуляції імунної активності у пацієнта.

3. Пептид за п. 1, де вказана імунна відповідь модулює розвиток раку.

4. Пептид за п. 3, де вказаний рак являє собою рак печінки.

5. Пептид за п. 3, де вказаний рак являє собою

(13) **C2**

(11) **83989**

(19) **UA**

меланому.

6. Фармацевтична композиція, яка складається з ефективної кількості пептиду за п. 1 і фармацевтично прийнятного носія.

7. Фармацевтична композиція за п. 6, яка стимулює протипухлинну імунну відповідь.

8. Фармацевтична композиція за п. 7, де вказана відповідь відбувається за рахунок модуляції імунної активності у пацієнта.

9. Фармацевтична композиція за п. 7, де вказана відповідь модулює розвиток раку.

10. Фармацевтична композиція за п. 9, де вказаний рак являє собою рак печінки.

11. Фармацевтична композиція за п. 9, де вказаний рак являє собою меланому.

12. Застосування фармацевтичної композиції за п. 6 у фармацевтично ефективній дозі для лікування захворювання ссавця, при якому необхідна стимуляція протипухлинної імунної відповіді.

13. Застосування за п. 12, де у вказаного ссавця діагностовано рак.

14. Застосування за п. 12, де вказаний рак являє

собою рак печінки.

15. Застосування за п. 12, де вказаний рак являє собою меланому.

16. Застосування фармацевтичної композиції за п. 6 у фармацевтично ефективній дозі для модуляції імунної відповіді у пацієнта, який страждає на захворювання, при лікуванні якого необхідна стимуляція протипухлинної імунної відповіді.

17. Застосування за п. 16, де вказана імунна відповідь полягає у збільшенні цитотоксичної активності NK клітин.

18. Застосування за п. 16, де вказана імунна відповідь полягає в посиленні синтезу анти-SRBC антитіл при антигенній стимуляції.

19. Застосування за п. 16, де вказана імунна відповідь полягає в посиленні фагоцитарної активності моноядерних фагоцитів.

20. Застосування за п. 16, де вказана імунна відповідь полягає в збільшенні ваги вилочкової залози.

21. Застосування за п. 16, де вказана імунна відповідь полягає у зниженні ваги селезінки.

Даний винахід відноситься до області імунології. Зокрема, даний винахід відноситься до пептидів і їх фармацевтичних композицій, здатних модулювати імунні відповіді.

Відоме застосування пептидів для лікування захворювань і як фармацевтичні композиції. Наприклад, у патенті США 6191113 описаний пептид, який володіє інгібуючою активністю для росту клітин гладкої мускулатури і таким чином може використовуватись для профілактики і лікування патологічних станів, пов'язаних з ростом клітин гладкої мускулатури, таких як атеросклероз, рестеноз після ангіопластики, звуження просвіту після трансплантації кровоносних судин і саркома гладкої

мускулатури. У патенті США 6184208 описаний інший пептид, який, як встановлено, модулює фізіологічні процеси, такі як активність приросту ваги зони епітеліального росту і росту волосся.

Таким чином, об'єктом даного винаходу є ідентифікація біологічно активних поліпептидів. Стандартними хімічними методами була синтезована множина пептидів і проведений скринінг їх біологічної активності. Пептидам привласнені коди, що мають букви CMS з подальшим номером. Усього було виявлено 30 пептидів, що володіють біологічною активністю in vivo. Послідовності і відповідні ідентифікаційні номери (ID) таких біологічно активних пептидів наведені в таблиці А.

Таблиця А

SEQ ID No:	Назва пептиду	Пептидна послідовність
1	CMS001	Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe
2	CMS002	Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe
3	CMS008	Lys Ala Val Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala Leu
4	CMS010	ValGlu Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Ala Pro Leu Asn Pro Lys
5	CMS012	Leu Tyr Gly Met Glu Ala Cys Gly He His Glu Thr Thr
6	CMS013	Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
7	CMS014	Ala Ala His His Pro Asp Asp Phe Asn Pro Ser Val
8	CMS015	Pro Val Ser He Val Gly Arg Pro Arg His Gin Gly Met
9	CMS016	He Thr Gly Met Glu Ser Ala Gly He His Glu Thr Tyr
10	CMS018	Val Gly Met Gly Glu Lys Asp Ser Tyr
11	CMS019	Val Gly Met Gly Gin Lys Asp Ser Tyr
12	CMS020	Val Gly Met Gly Gin Lys Asp Ser Tyr Val
13	CMS021	Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu
14	CMS022	Tyr Ser Phe
15	CMS023	Ala Ala Phe
16	CMS024	Tyr Ser Leu
17	CMS026	Thr Thr Tyr Asn Ser He Met
18	CMS027	Phe Glu Glu Asn Met
19	CMS028	Phe Glu Pro Ser Phe

Продовження таблиці А

SEQ ID No:	Назва пептиду	Пептидна послідовність
20	CMS029	Phe Asn Glu Glu
21	CMS030	Phe Glu Glu Met
22	CMS032	Phe Glu Glu Glu
23	CMS033	Phe Glu Ser Phe
24	CMS034	Pro Glu Asn Phe
25	CMS035	Phe Val Asn Asp
26	CMS036	Phe Gin Pro Ser Phe
27	CMS003	Phe Asn Phe Val Pro Pro
28	CMS007	Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe
29	CMS009	Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
30	CMS011	Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu

Відповідно, один з аспектів даного винаходу відноситься до по суті чистих пептидів, що мають послідовності, ідентифіковані як послідовності SEQ ID No: 1-30. Таким чином, даний винахід також відноситься до по суті чистих пептидів, що включають амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до по суті чистого пептиду, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. В конкретному варіанті здійснення пептиди можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, одне або більше з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до по суті чистих пептидів, які є функціональними похідними пептидів, що мають послідовності, ідентифіковані як послідовності з ID No: 1-30. Таким чином, даний винахід також відноситься до по суті чистого пептиду, що включає амінокислотну послідовність, яка є функціональною похідною амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до по суті чистого пептиду, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, яка являє собою функціональне похідне амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. У конкретному варіанті здійснення пептиди, які є функціональними похідними, можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, одне або декілька з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до нуклеїнових кислот, які мають послідовності, що кодують пептиди, ідентифіковані вище як послідовності SEQ ID No: 1-30. Додатковий аспект даного винаходу відноситься до векторів експресії, які містять послідовності нуклеїнових кислот пептидів, показані нижче як послідовності SEQ ID No: 1-30. Таким чином, даний аспект даного винаходу також

відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка включає SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Винахід також відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що включає функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що складається головним чином з функціональної амінокислотної послідовності, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

Ще один аспект даного винаходу відноситься до гібридних пептидів, що містять лідерний або сигнальний пептид, суміжний з пептидом, при цьому пептид включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Даний винахід також відноситься до гібридних пептидів, що містять лідерний пептид, суміжний з пептидом, при цьому пептид включає функціональне похідне пептиду, який має амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

Даний винахід також відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, що включає функціональну амінокислотну послідовність, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що включає SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до генетичного вектора, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, що складається головним чином з функціональної амінокислотної послідовності, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ

ID No: 1-30.

У конкретному варіанті здійснення пептиди, продуковані в будь-якому з вищезгаданих генетичних векторів, можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, одне або більше з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до мікроорганізму, геном якого включає нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид, що складається з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до мікроорганізму, геном якого включає нуклеотидну послідовність, що кодує пептид, який складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до мікроорганізму з генетичним матеріалом, який включає нуклеотидну послідовність, що кодує екзогенний пептид, який включає функціональну амінокислотну послідовність, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до мікроорганізму з генетичним складом, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує екзогенний пептид, що складається головним чином з функціональної амінокислотної послідовності, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Термін «екзогенний пептид», як використано в даному описі, відноситься до пептиду, що має амінокислотну послідовність, яка відрізняється від будь-якого іншого пептиду, звичайно експресованого мікроорганізмом у своїй природній немодифікованій формі.

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до мікроорганізму з генетичним складом, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує екзогенний гібридний пептид, що включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, пептид включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до мікроорганізму, геном якого включає нуклеотидну послідовність, що кодує гібридний пептид, який включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до мікроорганізму з генетичним складом, що включає нуклеотидну послідовність, яка кодує екзогенний гібридний пептид, що включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, при цьому пептид включає функціональну амінокислотну послідовність, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до мікроорганізму з генетичним складом, що включає нуклеотидну

послідовність, яка кодує екзогенний гібридний пептид, що включає лідерну амінокислотну послідовність, суміжну з пептидом, який складається головним чином з функціональної амінокислотної послідовності, яка являє собою функціональне похідне біологічно активної амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

У конкретному варіанті здійснення пептиди, продуковані будь-яким з вищезгаданих мікроорганізмів, можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, одне або більше з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

У наступному аспекті даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що включає по суті чистий пептид, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка включає по суті чистий пептид, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що включає по суті чистий пептид, який включає функціональне похідне амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до фармацевтичної композиції, що включає по суті чистий пептид, який складається головним чином з функціонального похідного амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30. Крім того, винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що складається з по суті чистого пептиду, який складається головним чином з функціонального похідного амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

У конкретному варіанті здійснення пептиди у складі будь-якої з вищезгаданих фармацевтичних композицій можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, одне або більше з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

У наступному аспекті даний винахід відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає одержання по суті чистого пептиду, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30, і змішування вказаного по суті чистого пептиду з фармацевтично прийнятним носієм. Він також відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає одержання по суті чистого пептиду, який складається головним чином з амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає одержання по суті чистого пептиду,

який включає амінокислотну послідовність, яка є функціональним похідним амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30; і змішування вказаного по суті чистого пептиду з фармацевтично прийнятним носієм.

Винахід далі відноситься до способу одержання фармацевтичної композиції, який включає одержання по суті чистого пептиду, що складається головним чином з амінокислотної послідовності, яка є функціональним похідним амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

У зв'язку з будь-яким з вищезгаданих способів, пептид може модулювати, але не обмежується модулюванням, одне або більше з наступного: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

Ще в одному аспекті даний винахід відноситься до способу лікування людини, який включає введення людині фармацевтично ефективної дози по суті чистого пептиду, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID No: 1-30. Він також відноситься до способу лікування людини, який включає введення людині фармацевтично ефективної дози по суті чистого пептиду, що включає амінокислотну послідовність, яка являє собою функціональне похідне амінокислотної послідовності, вибраної з групи, що складається з SEQ ID No: 1-30.

У конкретному варіанті здійснення описані вище пептиди, що використовуються для лікування людини, можуть використовуватись для модулювання, але не обмежуються модулюванням, одного або більше з наступних станів людини: імунної активності; інфекції гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефриту; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

У зв'язку з будь-якими вищеописаними послідовностями нуклеїнових кислот, пептиди і/або гібридні пептиди, експресовані з даних послідовностей нуклеїнових кислот, можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, наступне: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

Інший аспект даного винаходу відноситься до способу лікування захворювань, що включає введення фармацевтично ефективної дози по суті чистого пептиду, з послідовністю SEQ ID No: 1 - SEQ ID No: 30. У конкретному варіанті здійснення пептиди можуть модулювати, але не обмежуються модулюванням, наступне: імунну активність; інфекцію гепатиту, включаючи, але не обмежуючись, інфекцію гепатиту В; нефрит; ріст ракової пухлини, включаючи, але не обмежуючись цим, саркому, рак печінки, лейкоз і меланому; і вагу тіла.

Як описано вище, інший варіант здійснення даного винаходу являє собою пептид або поліпеп-

тид, що складається головним чином з пептидів за даним винаходом. Як використано в даному описі термін «що складається головним чином з» відноситься до пептиду або поліпептиду, який включає амінокислотну послідовність пептидів за даним винаходом нарівні з додатковими амінокислотами на карбоксильному і/або амінному кінцях, і який підтримує активність представлених тут пептидів за даним винаходом. Таким чином, як необмежувальний приклад, коли активність пептиду за даним винаходом полягає у модулюванні імунної активності, пептид або поліпептид, «що складається головним чином» з пептиду за даним винаходом, буде володіти активністю модулювання імунної активності, як представлено тут відносно пептиду, і не буде володіти якими-небудь характеристиками, які значно знижують здатність пептиду або поліпептиду модулювати імунну активність, або які вносять значущу зміну в основні і нові характеристики пептиду як модулятор імунної активності. Таким чином, в наведеному вище прикладі повнорозмірний природний поліпептид, який володіє первинною активністю, яка відрізняється від модулювання імунної активності, і який де-небудь в собі містить амінокислотну послідовність пептиду за даним винаходом, не буде являти собою пептид або поліпептид, «що складається головним чином» з пептиду за даним винаходом. Аналогічним чином у вищезгаданому прикладі генетично сконструйований пептид або поліпептид, який володіє первинною активністю, що відрізняється від модулювання імунної активності, але включає де-небудь в собі амінокислотну послідовність пептиду за даним винаходом, не буде являти собою пептид або поліпептид, «що складається головним чином» з пептиду за даним винаходом.

Крім використаного вище прикладу модулювання імунної активності, наведене вище визначення також відноситься до всіх пептидів даного винаходу відносно видів активності, якими володіють такі пептиди. Зокрема, наведене вище визначення відноситься до пептидів винаходу, що володіють активністю модулювання міри вірусного інфікування, модулювання міри інфекції гепатиту, модулювання міри нефриту, модулювання росту ракової пухлини або модулювання ваги тіла, як зазначено нижче в докладному описі.

Фахівці в даній області легко зможуть визначити, складається або не складається пептид або поліпептид головним чином з пептиду за даним винаходом в рамках наведених вище визначень, за допомогою вимірювання активності пептиду або поліпептиду з використанням аналізів модулювання імунної активності, модулювання міри вірусного інфікування, модулювання міри інфекції гепатиту, модулювання міри нефриту, модулювання росту ракової пухлини або модулювання ваги тіла, які забезпечуються тут для конкретних пептидів за даним винаходом.

У переважному варіанті здійснення термін «що складається головним чином з» відноситься до пептидів або поліпептидів, які мають менше 20 амінокислотних залишків в доповнення до пептиду згідно з даним винаходом. У більш переважному варіанті здійснення та ж термінологія відноситься

до пептидів, що мають менше 15 амінокислотних залишків в доповнення до пептиду згідно з даним винаходом. У ще більш переважному варіанті здійснення та ж термінологія відноситься до пептидів, що мають менше 10 амінокислотних залишків в доповнення до пептиду згідно з даним винаходом. Ще в одному переважному варіанті здійснення та ж термінологія відноситься до пептидів або поліпептидів, що мають менше 6 амінокислотних залишків в доповнення до одного з пептидів згідно з даним винаходом. В іншому переважному варіанті здійснення та ж термінологія відноситься до пептидів або поліпептидів, що мають менше 4 амінокислотних залишків в доповнення до одного з пептидів згідно з даним винаходом. У найбільш переважному варіанті здійснення та ж термінологія відноситься до пептидів або поліпептидів, що мають менше 2 амінокислотних залишків в доповнення до одного з пептидів згідно з даним винаходом.

Пептиди легко можуть бути синтезовані стандартними синтетичними способами з L-амінокислот, а також можуть бути синтезовані методами генної інженерії з використанням нуклеїнових кислот, що мають послідовності, які кодують конкретні пептиди.

І. Біологічна активність

Для дослідження можливої біологічної активності пептидів вивчали імунологічну дію пептидів на тваринній моделі за допомогою методик, відповідних «Принципам доклінічного дослідження нових лікарських засобів», випущених Міністерством охорони Здоров'я Народної республіки Китай [1].

Для виявлення якого-небудь можливого впливу пептидів на специфічну клітинну імунну функцію використали тест трансформації Т-лімфоцитів, тест цитотоксичної активності NK клітин і тест секреції Т-лімфоцитами IL-2 і IFN- γ . Тест очищення частинками вугілля використали для виявлення якого-небудь можливого впливу пептидів на неспецифічну клітинну імунну функцію. Гемоліз овечих еритроцитів (SRBC) використали для виявлення якого-небудь можливого впливу пептидів на гуморальну імунну функцію. Тест зі зважуванням імунного органу використали для виявлення якого-небудь можливого впливу пептидів на органному рівні.

У такому дослідженні групу, що одержує фізіологічний розчин, використали як негативний контроль, тоді як групи, що одержують IL-2 і IFN- γ , використали як позитивні контролю, оскільки IL-2 і IFN- γ являють собою добре відомі імуностимулятори [10]. У такому дослідженні використали чотири довільних концентрації зразків пептидів для того, щоб перекрити 1000-кратний діапазон дозування. Через внутрішню складність імунологічної відповіді *in vivo* і відсутність попередніх даних про реакцію у відповідь в залежності від дозування, як позитивну біологічну активність розглядали будь-яку статистично значущу відмінність відносно негативного контролю в будь-якій з груп дозування.

Результати даного дослідження були наступними:

1. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009,

CMS010, CMS011, CMS012, CMS015, CMS019, CMS021, CMS029 і CMS034 здатні посилювати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин. Також встановлено, що пептиди CMS014 і CMS036 здатні інгібувати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

2. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS002, CMS003, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS015, CMS016, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні збільшувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин. Також встановлено, що пептиди CMS008 і CMS012 у відповідній концентрації здатні знижувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

3. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS003, CMS007, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS015, CMS020, CMS022 і CMS034 здатні посилювати секрецію інтерлейкіну-2 (IL-2) Т-лімфоцитами, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

4. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS016, CMS021, CMS022 і CMS028 здатні посилювати секрецію IFN Т-лімфоцитами, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

5. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні посилювати синтез анти-SRBC антитіл при антигенній стимуляції, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин. Також встановлено, що пептиди CMS002, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS018, CMS019, CMS020, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS034 і CMS036 у відповідній концентрації здатні інгібувати синтез анти-SRBC антитіл при антигенній стимуляції, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

6. Встановлено, що пептиди CMS003, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS024, CMS027, CMS030, CMS035, CMS036 здатні посилювати фагоцитарну активність моно-

ядерних фагоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

7. Встановлено, що пептиди CMS001, CMS002, CMS008, CMS010, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні збільшувати вагу виличкової залози, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

8. Встановлено, що пептиди CMS019, CMS020 і CMS030 здатні збільшувати вагу селезінки, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин. Також було встановлено, що пептиди CMS001, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS021, CMS023, CMS024, CMS027, CMS029 і CMS036 у відповідній концентрації здатні знижувати вагу селезінки, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з нормальною контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин.

Нижче описані матеріали і методи, використані для аналізу впливу пептидів на мишах:

Матеріали:

1. Експериментальна тварина

Миші BALB/c, вага 18-22г, 50% самиць і 50% самців, надані Центром експериментальних тварин, Національний Інститут медичних наук (National Institute of Medical Science), КНР.

2. Введення

Група рекомбінантного мишачого IFN- γ (mIFN- γ): 3×10^5 МО/кг/день

Група рекомбінантного людського IL (rhIL)-2: 3×10^5 МО/кг/день

Група фізіологічного розчину: 0,5мл/кожний день

доза пептиду в I групі: 500мкг/кг/день

доза пептиду у II групі: 50мкг/кг/день

доза пептиду в III групі: 5мкг/кг/день

доза пептиду в IV групі: 0,5мкг/кг/день

Всі вищезгадані речовини розчиняли в 0,5мл фізіологічного розчину і вводили внутрішньоочеревинно (i.p.) безперервно протягом 15 днів, один раз на день.

3. Основні реагенти

Пептиди були вироблені звичайним чином American Peptide Company, Inc., США

Фетальна теляча сироватка і клітинне культуральне середовище RPMI-1640 від Gibco, США

MTT і ConA, Sigma, США

rmIFN- γ , Beijing Biotech Inc., Китай

rhIL-2, Shanghai Huaxin Biotech Inc., Китай

Розчин для відділення лімфоцитів, Науково-дослідний інститут Гематологічних захворювань, Національний інститут медичних наук, КНР.

Вірус везикулярного стоматиту (VSV), IFN- γ і IL-2 стандартні зразки, Національний Інститут контролю фармацевтичних і біологічних продуктів, КНР.

HT-2 клітини і L929 клітини, дарунок Професора WF Chen, факультет імунології Пекінського Університету Beijing, КНР.

Метод

1. Вплив пептидів на клітинний імунітет

1.1. Одержання суспензії клітин селезінки [1, 2]

Мишей BALB/c випадковим чином розподіляли на групи пептиду, IFN, IL-2 і фізіологічного розчину. Десять мишей на групу. Через день після останнього введення речовини мишей, що досліджуються, вбивали, змішавши шийні хребці. Селезінку видаляли в асептичних умовах і вручну диспергували в холодному розчині D-Hank з використанням голки для ін'єкцій. Дисперговану клітинну суспензію додатково пропускали через сито 100 калібру з нержавіючої сталі діаметром 150мкм. Після центрифугування при 200g протягом 10 хвилин супернатант (надосадову рідину) відкидали. Осад клітин повторно суспендували в 10 об'ємах буфера Tris-NH₄Cl і потім залишали на 10 хвилин при кімнатній температурі. Суспендовані клітини збирали центрифугуванням при 150g протягом 10 хвилин. Клітини промивали 2-4 рази холодним розчином D-Hank шляхом ресуспендування і центрифугування при описаних вище умовах. Промиті клітини потім розводили до бажаної щільності клітин з використанням культурального середовища RPMI-1640, що містить 10% фетальної телячої сироватки.

1.2. Вплив пептидів на трансформацію Т-лімфоцитів

Клітини селезінки щільністю 1×10^6 мл мішували в 96-ямові планшети для клітинних культур, 100мкл/ямку, три паралельних ямки для кожного зразка, що аналізується, і контрольний зразок для кожної миші. У ямки, що аналізуються, додавали 100мкл/ямку ConA розчину 100мкг/мл в RPMI-1640 і 100мкл/ямку просто RPMI-1640 використали для контролю. Клітини інкубували протягом 66 годин при 37°C, 5% CO₂. Клітини потім осаджували центрифугуванням при 150g протягом 10 хвилин. Супернатант збирали і зберігали при -20°C для визначення цитокінів IL-2 і IFN.

50мкл/ямку МТТ розчину 1мг/мл в RPMI-1640 додавали до осаду клітин і клітини повторно суспендували струшуванням протягом 2 хвилин. Інкубацію продовжували протягом 4 годин. Супернатант відкидали після центрифугування при 150g протягом 10 хвилин. 120мкл 40мм HCl в пропанолі-2 додавали до осаду клітин і струшували протягом 3 хвилин для одержання ОЩ_{570nm} для кожної ямки, нормованої для 630nm. Використали рідер ELISA.

Розрахунки:

Для кожної миші формували три ямки, що аналізуються, і три контрольних ямки. Індекс стимуляції (SI) для кожної миші одержували, спочатку одержуючи середню ОЩ (оптичну щільність) для трьох паралельних ямок, а потім ділячи значення для ямок, що аналізуються, на значення для контрольних ямок.

1.3. Вплив пептидів на NK клітинну активність [3, 4]

Одержували мишачі клітини селезінки щільністю 4×10^6 мл, як описано вище в розділі 1.1. Кліти-

ни-мішені YAC-1 брали в логарифмічній фазі і доводили до 1×10^5 мл. З використанням 96-ямкових планшетів для культур клітин 100мкл клітин мишачої селезінки і 100мкл культурального середовища додавали в контрольну ямку, що містить тільки клітини селезінки; 100мкл клітин-мішеней і 100мкл культурального середовища додавали в контрольну ямку, що містить тільки клітини-мішені; 100мкл клітин мишачої селезінки і 100мкл клітин-мішеней додавали в ямки для аналізу NK активності. Готували три паралельних серії вищезгаданих ямок на мишу.

Зразки центрифугували при 150g протягом 10 хвилин для того, щоб зібрати клітини. Супернатант відкидали і додавали 50мкл/ямку МТТ розчину 1мг/мл. Реакційну суміш потім струшували протягом 2 хвилин та інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 4 годин. Супернатант відкидали після центрифугування при 150g протягом 10 хвилин. Додавали 120мкл 40мм HCl в пропанолі-2 і струшували протягом 3 хвилин. Рідер ELISA використали для одержання ОЩ_{570nm} для кожної ямки, нормованої для 630nm.

Розрахунок:

Для кожної миші було 9 ямок: три ямки з клітинами селезінки - тільки контроль, три з клітинами-мішенями - тільки контроль і три ямки, що аналізуються, як з клітинами селезінки, так і з клітинами-мішенями. Індекс NK клітинної активності для кожної миші одержували, спочатку одержуючи середню ОЩ для трьох паралельних ямок кожної комбінації, потім використовуючи таку середню ОЩ в наступній формулі:

Індекс активності NK клітин = $[1 - (\text{середня ОЩ ямки з клітинами селезінки і клітинами-мішенями} - \text{середня ОЩ ямки тільки з клітинами селезінки}) + (\text{середня ОЩ ямки тільки з клітинами-мішенями})] \times 100\%$.

1.4. Вплив пептидів на активність Т-лімфоцитів при секретуванні IL-2 [5].

HT-2 клітини в логарифмічній фазі збирали центрифугуванням при 150g протягом 10 хвилин і промивали три рази холодним розчином Хенка за допомогою повторного суспендування і центрифугування. Зібрані HT-2 клітини повторно суспендували в RPMI-1640 та інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 30 хвилин. Клітини додатково промивали двічі RPMI-1640 за допомогою повторного суспендування і центрифугування і ресуспендували до кінцевої концентрації 2×10^5 /мл в середовищі RPMI-1640.

Одержаний в розділі 1.2 супернатант розводили середовищем RPMI-1640 до наступних процентних концентрацій: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% і 3,125%.

rIL-2 розводили середовищем RPMI-1640 до наступних концентрацій: 500МО/мл, 250МО/мл, 125МО/мл, 62,5МО/мл, 31,25МО/мл і 15,5МО/мл.

У 96-ямковому планшеті для клітинних культур використали три паралельні ямки для комбінації:

Негативний контроль: 100мкл RPMI-1640 + 100мкл суспензії HT-2 клітин rIL-2 стандарт: 100мкл розчину rIL-2 + 100мкл суспензії HT-2 клітин

Ямки, що аналізуються: 100мкл розведеного

супернатанту + 100мкл суспензії HT-2 клітин

Планшет інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 68 годин, потім центрифугували при 150g протягом 15 хвилин і супернатант видаляли. В кожну ямку додавали 100мкл 0,5мг/мл МТТ в RPMI-1640 без фенолсульфонафталіну. Після струшування протягом 3-4 хвилин для ресуспендування клітин продовжували інкубування додатково протягом 4 годин. Потім зразки центрифугували при 150g протягом 15 хвилин і супернатант видаляли. В кожну ямку додавали 120мкл 40мм HCl в 2-пропанолі, перемішували протягом 3-4 хвилин і з використанням планшетного рідера ELISA аналізували ОЩ при 570nm, нормовану для 630nm.

Розрахунок:

Брали середнє значення ОЩ для трьох паралельних ямок для кожного розведення і будували графік відносно концентрації на напівлогарифмічній шкалі, відкладаючи концентрацію по осі X. Одержували значення концентрації при 50% насиченні ОЩ як для супернатанту, що тестується, так і для rIL-2.

IL-2 активність зразка = (розведення зразка при 50% максимальній активності + стандартне розведення rIL-2 при 50% максимальній активності) активність rIL-2 стандарту при 50% максимальної активності (МО/мл).

1.5. Вплив пептидів на активність Т-лімфоцитів при секретуванні інтерферону (IFN) [6]

Супернатант, одержаний в розділі 1.2, розводили культуральним середовищем RPMI-1640 до наступних процентних концентрацій: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% і 3,125%.

Стандарт рекомбінантного інтерферону (rIFN) розводили середовищем RPMI-1640 до наступних концентрацій: 500МО/мл, 250МО/мл, 125МО/мл, 62,5МО/мл, 31,25МО/мл і 15,5МО/мл.

Клітини-мішені L929 у логарифмічній фазі доводили до концентрації 2×10^5 /мл середовищем RPMI-1640 при такій же обробці, як описано в розділі 1.4 для клітин HT-2. Вихідний VSV також доводили до 100 TCID₅₀ середовищем RPMI-1640.

У 96-ямковому планшеті для клітинних культур використали три паралельні ямки для комбінації:

Негативний контроль: 150мкл RPMI-1640 + 100мкл L929

Ямка позитивного контролю: 100мкл розчину RPMI-1640 + 100мкл L929 + 50мкл VSV

Ямка активності rIFN: 100мкл rIFN стандарту + 100мкл L929 + 50мкл VSV

Ямка, що аналізується: 100мкл розведеного супернатанту + 100мкл L929 + 50мкл VSV

Зразки інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 24 годин. Ямки позитивного контролю періодично спостерігали у зверненому мікроскопі для підтвердження лізису клітин, потім збирали, промивали і ОЩ всіх ямок зчитували, як описано в розділі 1.4.

Розрахунок:

Концентрації при 50% максимальній активності одержували таким же чином, як в розділі 1.4. Розраховували IFN активність зразка таким чином:

IFN активність зразка = (розведення зразка при 50% максимальній активності + стандартне розведення rIFN при 50% максимальній активності) x активність rIFN стандарту при 50% максима-

льній активності (МО/мл).

2. Вплив пептидів на утворення антитіл [7]

Одержували еритроцити овець (SRBC), збираючи кров з шийної вени і вміщуючи її у стерильну колбу зі скляними кульками. Колбу струшували протягом 3 хвилин і потім кров змішували з розчином Альзевера (Alsever) (глюкоза 2,05г, NaCl 0,4г, лимонад Na 0,8г, доводили до 100мл дистильованою водою) і зберігали при 4°C. Безпосередньо перед використанням зразки центрифугували при 130g протягом 5 хвилин, збираючи SRBC. Клітини двічі промивали ресуспендуванням і центрифугуванням в нормальному фізіологічному розчині. Потім осад клітин збирали центрифугуванням при 180g протягом 10 хвилин і повторно суспендували у фізіологічному розчині, одержуючи кінцеву робочу суспензію SRBC, 2% (об./об.).

Комплемент одержували, додаючи 10 об'ємів свіжої сироватки крові морської свинки до одного об'єму ущільненого на центрифугу SRBC і потім обережно струшуючи протягом 30 хвилин при 4°C. SRBC видаляли центрифугуванням при 200g протягом 10 хвилин. Для одержання робочого комплементного розчину додавали 10 об'ємів звичайного фізіологічного розчину.

Мишей BALB/c випадковим чином розподіляли на групу пептиду, IFN групу, IL-2 групу і групу, яка одержує фізіологічний розчин, 10 мишей на групу. Речовини, що тестуються, вводили, як описано в розділі 1.1, плюс внутрішньоочеревинна ін'єкція 0,2мл SRBC на мишу на 12 день. Через день після останнього введення речовини (16 день), що тестується, збирали кров з кута очної щілини і залишали при кімнатній температурі на одну годину для виділення сироватки крові. Після центрифугування при 200g протягом 10 хвилин сироватку крові розводили в 500 разів з використанням звичайного фізіологічного розчину.

До 1мл розведеної мишачої сироватки крові для кожної миші додавали 0,5мл суспензії SRBC. Охолоджували на льоду. Потім додавали 1мл робочого розчину комплементу та інкубували при 37°C на водяній бані протягом 10 хвилин. Реакцію зупиняли охолодженням льодом. Потім зразки центрифугували при 200g протягом 10 хвилин, одержуючи супернатант.

До 1мл даного супернатанту додавали 3мл розчину Драбкіна (Drabkin) і залишали при кімнатній температурі на 10 хвилин. Одержували ОШ_{540nm}.

Розрахунок:

Стандартизовану ОШ_{540nm} одержували, змішуючи 0,25мл суспензії SRBC з розчином Драбкіна до 4мл і залишаючи суміш на 10 хвилин перед одержанням ОШ_{540nm}.

Індекс сироватки зразка = (ОШ_{540nm} зразка, що

тестується ÷ стандартизована ОШ_{540nm})x500

3. Вплив пептидів на фагоцитарну функцію моноядерного фагоцита і вагу імунного органу [8, 9]

На наступний день після останнього введення речовини (16 день), що досліджується, мишам робили ін'єкцію туші з розрахунку 0,1мл/кг ваги тіла (5 кратне розведення звичайним фізіологічним розчином) в хвостову вену.

Через одну хвилину і п'ять хвилин після ін'єкції туші відбирали 20мкл крові з кута очної щілини за допомогою гепаринізованої трубки. Кров змішували з 2мл 0,1% ваг./об. розчину Na₂CO₃ і потім одержували ОШ_{680nm}. Основний індекс виведення К розраховували за наступною формулою:

$$K = (lg A_1 - lg A_2) / (t_2 - t_1)$$

Ключ:

A1: ОШ_{680nm} на першій хвилині

A2: ОШ_{680nm} на п'ятій хвилині

t2: 5 хвилин

t1: 1 хвилинка

Через день після останнього введення речовини (16 день), що досліджується, печінку, селезінку і виличкову залозу відділяли, промокали досуха фільтрувальним папером і зважували. Фагоцитарний індекс а розраховували, як показано нижче:

$$\alpha = \left(\frac{1}{\sqrt{K}} \right) \times (W \div W_{LS})$$

Ключ:

W: вага тіла

W_{LS}: вага печінки плюс селезінка

Індекс виличкової залози (%) = (вага виличкової залози/вага тіла)x100%

Індекс селезінки (%) = (вага селезінки/вага тіла)x100%

Результати

Через велику кількість включених «вихідних» даних, представлені тільки компільовані кінцеві результати. Групи, що не мали статистично значущої відмінності від негативного контролю з групою, яка одержує фізіологічний розчин, також опущені.

1. Вплив пептидів на трансформацію Т-лімфоцитів

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS002, CMS007, CMS008, CMS010, CMS012, CMS015, CMS019, CMS021 і CMS029 здатні посилювати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS010 і CMS015 статистично значуще відрізняються від групи IFN-γ і IL-2 групи (P<0,05), як показано нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

Група	N	X±SD (індекс стимуляції)
CMS002	8	1,8±0,3*
CMS007	9	1,6±0,1*
CMS008	9	1,7±0,1*

Продовження таблиці 1

Група	N	X±SD (індекс стимуляції)
CMS009	10	1,7±0,2*
CMS010	9	2,0±0,3* [@] [^]
CMS012	9	1,6±0,2*
CMS015	9	1,9±0,3* [@] [^]
CMS019	9	1,8±0,3*
CMS021	10	1,6±0,1*
CMS029	9	1,7±0,3*
DFN-γ	10	1,6±0,2*
IL-2	10	1,7±0,2*
Фізіологічний розчин	10	1,3±0,1

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

[@] порівняння з IFN-γ групою P<0,05[^] порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS001, CMS002 і CMS003 здатні стимулювати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин, IFN-γ групою і IL-2 групою (P<0,05). Показано, що CMS014 і CMS036

здатні інгібувати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Докладні дані наведені нижче в таблиці 2.

Таблиця 2

Група	N	X±SD (індекс стимуляції)
CMS001	10	2,2±0,5* [@] [^]
CMS002	10	2,6±0,3* [@] [^]
CMS003	8	2,2±0,5* [@] [^]
CMS014	9	1,0±0,1*
CMS036	9	1,0±0,1*
IFN-γ	9	1,7±0,2*
IL-2	10	1,8±0,2*
Фізіологічний розчин	10	1,3±0,1

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

[@] Порівняння з IFN-γ групою P<0,05[^] порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS001, CMS003, CMS007 і CMS034 здатні стимулювати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статис-

тично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05), як показано в таблиці 3.

Таблиця 3

Група	N	X±SD (індекс стимуляції)
CMS001	10	1,7±0,2*
CMS003	10	1,6±0,2*
CMS007	8	1,7±0,1*
CMS034	9	1,5±0,2*
IFN-γ	10	1,6±0,2*
IL-2	9	1,6±0,1*
Фізіологічний розчин	10	1,3±0,1

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS008, CMS010 і CMS011 здатні стимулювати трансформацію Т-лімфоцитів, виявляючи статис-

тично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05), як показано в таблиці 4.

Таблиця 4

Група	N	X±SD (індекс стимуляції)
CMS008	10	1,7±0,3*
CMS010	9	1,7±0,3*
CMS011	10	1,6±0,4*
IFN-γ	10	1,6±0,2*
IL-2	10	1,6±0,1*
Фізіологічний розчин	10	1,3±0,1

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

2. Вплив пептиду на цитотоксичну активність NK клітин

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS010, CMS013, CMS016, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні збільшувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмін-

ність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS010, CMS016 і CMS030 виявляють статистично значущу відмінність з IFN-γ групою і IL-2 групою (P<0,05), як показано таблиці 5.

Таблиця 5

Група	N	X±SD (%)
CMS010	9	91±4 ^{*^}
CMS013	8	84±9*
CMS016	9	91±7 ^{*^}
CMS023	10	79±12*
CMS024	10	89±8*
CMS026	10	89±7*
CMS027	10	88±8*
CMS028	10	90±5*
CMS029	10	87±4*
CMS030	10	91±5 ^{*@^}
CMS032	10	87±5*
CMS033	9	89±8*
CMS034	11	85±9*
CMS035	8	90±10*
CMS036	10	88±7*
IFN-γ	10	77±8*
IL-2	8	77±8*
Фізіологічний розчин	10	63±9

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS001, CMS003, CMS015, CMS021, CMS026 і CMS035 здатні збільшувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS021 виявляє статистично

значущу відмінність з IFN-γ групою і IL-2 групою (P<0,05). Показано, що CMS012 здатний інгібувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Докладні дані наведені нижче в таблиці 6.

Таблиця 6

Група	N	X \pm SD (%)
CMS001	10	85 \pm 10*
CMS003	10	85 \pm 6*
CMS012	9	40 \pm 9*
CMS015	8	78 \pm 8*
CMS021	8	88 \pm 12* ^{@^}
CMS026	10	76 \pm 9*
CMS035	10	72 \pm 9*
IFN- γ	10	73 \pm 10*
IL-2	10	74 \pm 8*
Фізіологічний розчин	10	56 \pm 8

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,5

@ порівняння з IFN- γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS020, CMS024, CMS034 і CMS036 здатні збільшувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин

(P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS008 і CMS009 виявляють статистично значущу відмінність з IFN- γ групою і IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 7.

Таблиця 7

Група	N	X \pm SD (%)
CMS008	10	92 \pm 4* ^{@^}
CMS009	8	92 \pm 6* ^{@^}
CMS010	10	82 \pm 9*
CMS011	10	76 \pm 10*
CMS012	10	85 \pm 7*
CMS020	9	91 \pm 6*
CMS024	9	78 \pm 3*
CMS034	8	90 \pm 5*
CMS036	10	75 \pm 9*
IFN- γ	10	80 \pm 8*
IL-2	10	80 \pm 8*
Фізіологічний розчин	10	60 \pm 9

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN- γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS002, CMS011, CMS012, CMS022, CMS028 і CMS035 здатні збільшувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Знайдено, що

CMS008 здатний інгібувати цитотоксичну активність NK клітин, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Докладні дані наведені нижче в таблиці 8.

Таблиця 8

Група	N	X \pm SD (%)
CMS002	8	76 \pm 9*
CMS008	10	46 \pm 12*
CMS011	9	79 \pm 3*
CMS012	9	77 \pm 6*
CMS022	10	73 \pm 11*

Продовження таблиці 8

Група	N	X±SD (%)
CMS028	8	79±3*
CMS035	10	76±10*
IFN-γ	10	72±9*
IL-2	10	74±10*
Фізіологічний розчин	11	58±7

*порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

3. Вплив пептидів на активність Т-лімфоцита при секреції IL-2

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS007, CMS009, CMS010 і CMS015 здатні стимулювати секрецію IL-2 Т-лімфоцитами, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин

(P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS007 і CMS015 статистично значуще відрізняються від групи IL-2 (P<0,05). Також встановлено, що CMS009 і CMS010 виявляють статистично значущу відмінність при порівнянні як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою, як показано в таблиці 9.

Таблиця 9

Група	N	X±SD (ME)
CMS007	9	86±15*^
CMS009	10	114±13*^
CMS010	9	125±17*@^
CMS015	9	85±17*@^
IFN-γ	10	100±18*
IL-2	10	70±13*
Фізіологічний розчин	10	39±10

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

^порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS001 і CMS003 здатні стимулювати активність Т-лімфоцитів для секреції IL-2, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою,

яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних пептидів CMS003 статистично значуще відрізняється від групи IL-2 (P<0,05), як показано в таблиці 10.

Таблиця 10

Група	N	X±SD
CMS001	10	60±10*
CMS003	8	86±9*^
IFN-γ	9	99±16*
IL-2	10	72±12*
Фізіологічний розчин	10	39±10

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

^порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS007, CMS012 і CMS020 здатні стимулювати Т-лімфоцити до секреції IL-2, виявляючи статистич-

но значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05), як показано в таблиці 11.

Таблиця 11

Група	N	X±SD (MO)
CMS007	8	64±12*
CMS012	9	65±16*
CMS020	8	63±11*
IFN-γ	10	96±14*
IL-2	10	77±13*
Фізіологічний розчин	10	37±9

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS010, CMS011, CMS012, CMS022 і CMS034 здатні стимулювати Т-лімфоцити до секреції IL-2, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних

пептидів CMS034 має статистично значущу відмінність з групою IL-2 (P<0,05). Також встановлено, що CMS011 і CMS022 виявляють статистично значущу відмінність при порівнянні як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою, як показано в таблиці 12.

Таблиця 12

Група	N	X±SD (MO)
CMS010	9	66±11*
CMS011	10	101±19* [@] [^]
CMS012	8	59±13*
CMS022	9	109±14* [@] [^]
CMS034	10	85±10* [^]
IFN-γ	10	87±15*
IL-2	10	73±13*
Фізіологічний розчин	10	38±13

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

[^] порівняння з IL-2 групою P<0,05

4. Вплив пептидів на активність Т-лімфоцитів при секреції IFN

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS010, CMS013 і CMS016 здатні стимулювати Т-лімфоцити до секреції IFN (інтерферону), виявля-

ючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин, IFN-γ групою, і IL-2 групою, (P<0,05), як показано в таблиці 13.

Таблиця 13

Група	N	X±SD
CMS010	9	167±13* [@] [^]
CMS013	9	154±15* [@] [^]
CMS016	6	162±19* [@] [^]
IFN-γ	10	139±16*
IL-2	10	120±13*
Фізіологічний розчин	10	65±11

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

[^] порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS001, CMS003 і CMS021 здатні стимулювати Т-лімфоцити до секреції IFN, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встанов-

лено, що серед даних пептидів CMS021 має статистично значущу відмінність при порівнянні з IFN-γ групою і з IL-2 групою, як показано в таблиці 14.

Таблиця 14

Група	N	X±SD
CMS001	10	110±15*
CMS003	8	106±16*
CMS021	8	143±17* ^{@^}
IFN-γ	9	125±18*
IL-2	10	113±17*
Фізіологічний розчин	10	61±11

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою, P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS009 і CMS012 здатні стимулювати секрецію IFN Т-лімфоцитами, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує

фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS009 статистично значуще відрізняється від групи IL-2 (P<0,05), як показано в таблиці 15.

Таблиця 15

Група	N	X±SD (МО)
CMS009	10	121±15* ^{@^}
CMS012	9	86±9* ^{@^}
IL-2	9	105±14*
Фізіологічний розчин	10	66±10

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS010, CMS011, CMS022 і CMS028 здатні стимулювати секрецію IFN Т-лімфоцитами, виявляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин

(P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS010 і CMS022 статистично значуще відрізняються від IFN-γ групи і IL-2 групи (P<0,05), як показано в таблиці 16.

Таблиця 16

Група	N	X±SD
CMS010	9	142±18* ^{@^}
CMS011	10	89±18*
CMS022	9	145±13* ^{@^}
CMS028	10	96±13*
IFN-γ	10	124±16*
IL-2	10	107±13*
Фізіологічний розчин	10	64±13

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою, P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою, P<0,05

5. Вплив пептидів на утворення антитіл

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023, CMS024, CMS029, CMS033 і CMS035 здатні стимулювати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів CMS002, CMS003, CMS007,

CMS008, CMS013, CMS019, CMS024 і CMS035 статистично значуще відрізняються від IFN-γ групи (P<0,05). Також було виявлено, що CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS014, CMS015, CMS016, CMS020, CMS023, CMS029 і CMS033 мають статистично значущу відмінність як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 17.

Таблиця 17

Група	N	X±SD
CMS002	10	87±18* [@]
CMS003	10	96±18* [@]
CMS007	10	69±17* [@]
CMS008	10	82±15* [@]
CMS009	10	113±22* ^{@^}
CMS010	10	112±30* ^{@^}
CMS011	8	188±16* ^{@^}
CMS012	8	141±21* ^{@^}
CMS013	10	80±16* [@]
CMS014	10	130±24* ^{@^}
CMS015	10	136±22* ^{@^}
CMS016	8	143±38* ^{@^}
CMS018	10	66±16*
CMS019	10	91±26* [@]
CMS020	6	155±35* ^{@^}
CMS022	8	68±31*
CMS023	9	110±45* ^{@^}
CMS024	8	75±29* [@]
CMS029	8	115±22* ^{@^}
CMS033	10	143±27* ^{@^}
CMS035	10	88±16* [@]
IFN-γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
Фізіологічний розчин	10	32±7

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Показано, що в дозі 50мкг/кг/день CMS003, CMS011, CMS012, CMS013, CMS015, CMS021, CMS022, CMS023, CMS026, CMS027, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні стимулювати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних пептидів CMS011, CMS013 і CMS015 статистично значуще відрізняються від IFN-γ групи

(P<0,05). Також було виявлено, що CMS021, CMS022, CMS023, CMS026, CMS027, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 мають статистично значущу відмінність як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою (P<0,05).

Встановлено, що CMS009 здатний інгібувати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Докладні дані наведені нижче в таблиці 18.

Таблиця 18

Група	N	X±SD (Одиниці)
CMS003	10	52±11*
CMS009	8	13±5*
CMS011	9	67±9* [@]
CMS012	8	50±14*
CMS013	8	70±9* [@]
CMS015	10	54±9* [@]
CMS021	9	94±20* ^{@^}
CMS022	9	110±16* ^{@^}
CMS023	8	84±11* ^{@^}
CMS026	9	98±9* ^{@^}
CMS027	9	93±11* ^{@^}
CMS029	10	143±13* ^{@^}
CMS030	10	141±33* ^{@^}

Продовження таблиці 18

Група	N	X±SD (Одиниці)
CMS032	9	131±24* ^{@^}
CMS033	8	112±15* ^{@^}
CMS034	10	136±11* ^{@^}
CMS035	8	97±10* ^{@^}
CMS036	10	118±11* ^{@^}
IFN-γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
Фізіологічний розчин	10	32±7

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

[@] порівняння з IFN-γ групою, P<0,05[^] порівняння з IL-2 групою, P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS001, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS011, CMS012, CMS013, CMS015, CMS016, CMS019, CMS020, CMS021, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні стимулювати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Показано, що серед даних пептидів

CMS003, CMS008, CMS009, CMS012, CMS015, CMS016, CMS020 і CMS021 статистично значуще відрізняються від IFN-γ групи (P<0,05). Також було виявлено, що CMS001, CMS007, CMS011, CMS019, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 мають статистично значущу відмінність як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 19.

Таблиця 19

Група	N	X±SD (Одиниці)
CMS001	9	110±24* [@]
CMS003	9	91±24* [@]
CMS007	9	122±12* ^{@^}
CMS008	9	97±26* [@]
CMS009	8	79±18* [@]
CMS011	10	115±27* ^{@^}
CMS012	10	81±22* [@]
CMS013	10	93±28* [@]
CMS015	8	94±37* [@]
CMS016	9	93±32* [@]
CMS019	10	118±20* ^{@^}
CMS020	10	89±24* [@]
CMS021	9	82±30* [@]
CMS023	10	166±27* ^{@^}
CMS024	7	171±39* ^{@^}
CMS026	9	191±17* ^{@^}
CMS027	9	117±45* ^{@^}
CMS028	10	121±48* ^{@^}
CMS029	9	147±23* ^{@^}
CMS030	9	158±37* ^{@^}
CMS032	9	157±37* ^{@^}
CMS033	7	128±39* ^{@^}
CMS034	8	172±37* ^{@^}
CMS035	9	176±39* ^{@^}
CMS036	8	179±34* ^{@^}
IFN-γ	9	37±10
IL-2	10	71±11*
Фізіологічний розчин	10	32±7

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P < 0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою $P < 0,05$

^ порівняння з IL-2 групою $P < 0,05$

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS021, CMS023, CMS024, CMS027 і CMS033 здатні стимулювати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Показано, що серед даних пептидів CMS021 і CMS033 статистично значуще відрізняються від IFN- γ групи ($P < 0,05$). Також було виявлено, що CMS023, CMS024 і CMS027 мають статистично значущу відмінність як з IFN- γ групою,

так і з IL-2 групою ($P < 0,05$). Крім того, показано, що CMS002, CMS003, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS018, CMS019, CMS020, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS034 і CMS036 здатні інгібувати утворення анти-SRBC антитіла, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Докладні дані наведені нижче в таблиці 20.

Таблиця 20

Група	N	X \pm SD (Одиниці)
CMS002	9	4 \pm 1*
CMS003	9	2 \pm 1*
CMS009	9	2 \pm 1*
CMS010	10	10 \pm 3*
CMS011	10	5 \pm 3*
CMS013	10	7 \pm 1*
CMS014	10	15 \pm 6*
CMS015	9	13 \pm 4*
CMS018	9	3 \pm 1*
CMS019	9	12 \pm 3*
CMS020	9	10 \pm 3*
CMS021	9	57 \pm 9* [@]
CMS023	10	108 \pm 21* ^{@^}
CMS024	10	98 \pm 6* ^{@^}
CMS026	10	19 \pm 6*
CMS027	10	99 \pm 14* ^{@^}
CMS028	10	18 \pm 5*
CMS029	9	18 \pm 7*
CMS030	9	19 \pm 7*
CMS033	9	78 \pm 12* [@]
CMS034	10	20 \pm 2*
CMS036	9	20 \pm 6*
IFN- γ	9	37 \pm 10
IL-2	10	71 \pm 11*
Фізіологічний розчин	10	32 \pm 7

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P < 0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою, $P < 0,05$

^ порівняння з IL-2 групою, $P < 0,05$

6. Вплив пептидів на фагоцитарну активність моноядерного фагоцита.

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS003, CMS008, CMS020, CMS022 і CMS024 здатні посилювати фагоцитарну активність моноядерного фагоцита, маючи статистично значущу

відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Встановлено, що серед даних пептидів CMS022, має статистично значущу відмінність як з IFN- γ групою, так і з IL-2 групою ($P < 0,05$), як показано в таблиці 21.

Таблиця 21

Група	N	X±SD (фагоцитарний індекс)
CMS003	10	6,6±0,7*
CMS008	10	6,5±1,2*
CMS020	10	6,4±0,6*
CMS022	10	7,4±0,6* [@]
CMS024	10	6,4±1,0*
IFN-γ	10	6,4±0,9*
IL-2	9	5,7±0,8
Фізіологічний розчин	10	5,1±0,6

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою, P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою, P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS019, CMS024 і CMS030 здатні посилювати фагоцитарну активність моноядерного фагоцита, маючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою,

яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних пептидів CMS019 має статистично значущу відмінність з IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 22.

Таблиця 22

Група	N	X±SD (фагоцитарний індекс)
CMS019	9	6,7±0,9* [^]
CMS024	8	6,6±0,7*
CMS030	10	6,3±0,5*
IFN-γ	10	6,4±0,9*
IL-2	9	5,7±0,8
Фізіологічний розчин	10	5,1±0,6

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою, P<0,05

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS003*, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS013, CMS016, CMS018, CMS019 і CMS035 здатні посилювати фагоцитарну активність моноядерного фагоцита, маючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний

розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних пептидів CMS003, CMS009, CMS010, CMS016, CMS019 і CMS035 мають статистично значущу відмінність з IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 23.

Таблиця 23

Група	N	X±SD (фагоцитарний індекс)
CMS003	9	6,9±0,9* [^]
CMS008	9	6,4±0,5*
CMS009	9	6,9±0,9* [^]
CMS010	10	7,1±0,7* [^]
CMS011	10	6,4±1,1*
CMS013	10	6,7±0,2*
CMS016	9	6,9±0,8* [^]
CMS018	8	6,7±1,2*
CMS019	8	6,8±0,6* [^]
CMS035	9	6,9±0,9* [^]
IFN-γ	10	6,4±0,9*
IL-2	9	5,7±0,8
Фізіологічний розчин	10	5,1±0,6

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою, P<0,05

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS024, CMS027 і CMS036 здатні посилювати фагоцитарну активність моноядерного фагоцита, виявляючи статистично значущу відмінність у по-

рівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Встановлено, що серед даних пептидів CMS024 має статистично значущу відмінність з IL-2 групою ($P<0,05$), як показано в таблиці 24.

Таблиця 24

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (фагоцитарний індекс)
CMS024	10	$6,7 \pm 0,5^{**\wedge}$
CMS027	10	$6,4 \pm 0,6^*$
CMS036	9	$6,2 \pm 0,3^*$
IFN- γ	10	$6,4 \pm 0,9^*$
IL-2	9	$5,7 \pm 0,8$
Фізіологічний розчин	10	$5,1 \pm 0,6$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

\wedge порівняння з IL-2 групою, $P<0,05$

7. Вплив пептидів на вагу імунного органу

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS008, CMS010, CMS016, CMS019, CMS020, CMS022, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 здатні збільшувати вагу вилочкової залози, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний

розчин ($P<0,05$). Встановлено, що серед даних пептидів CMS027 і CMS034 мають статистично значущу відмінність з IL-2 групою ($P<0,05$). Також встановлено, що CMS008, CMS022, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033 і CMS035 мають статистично значущу відмінність як з IFN- γ групою, так і з IL-2 групою ($P<0,05$), як показано в таблиці 25.

Таблиця 25

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS008	8	$0,21 \pm 0,03^{*\wedge @}$
CMS010	10	$0,19 \pm 0,04^*$
CMS016	9	$0,18 \pm 0,05^*$
CMS019	10	$0,19 \pm 0,02^*$
CMS020	10	$0,19 \pm 0,04^*$
CMS022	9	$0,26 \pm 0,05^*$
CMS026	10	$0,20 \pm 0,03^*$
CMS027	8	$0,20 \pm 0,03^{**\wedge}$
CMS028	10	$0,19 \pm 0,02^*$
CMS029	10	$0,22 \pm 0,04^{*\wedge @}$
CMS030	8	$0,30 \pm 0,03^{*\wedge @}$
CMS032	8	$0,25 \pm 0,03^{*\wedge @}$
CMS033	9	$0,25 \pm 0,04^{*\wedge @}$
CMS034	9	$0,20 \pm 0,05^{**\wedge}$
CMS035	10	$0,21 \pm 0,03^{*\wedge @}$
CMS036	9	$0,18 \pm 0,02^*$
IFN- γ	10	$0,15 \pm 0,04$
IL-2	9	$0,14 \pm 0,03$
Фізіологічний розчин	9	$0,12 \pm 0,02$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою, $P<0,05$

\wedge порівняння з IL-2 групою, $P<0,05$

Встановлено, що в дозі 500мкг/кг/день CMS019 здатний збільшувати вагу селезінки зі статистично значущою відмінністю у порівнянні з контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$), як показано в таблиці 26. Встановлено, що CMS001, CMS003, CMS007, CMS009,

CMS011, CMS013, CMS014, CMS015, CMS021, CMS023, CMS024, CMS027 і CMS036 здатні знижувати вагу селезінки зі статистично значущою відмінністю у порівнянні з контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Докладні дані наведені нижче в таблиці 26.

Таблиця 26

Група	N	X±SD (%)
CMS001	10	0,43±0,07*
CMS003	8	0,40±0,04*
CMS007	9	0,32±0,05*
CMS009	9	0,41±0,03*
CMS011	9	0,41±0,04*
CMS013	10	0,44±0,07*
CMS014	10	0,40±0,03*
CMS015	9	0,36±0,07*
CMS019	9	0,63±0,08*
CMS021	9	0,36±0,04*
CMS023	9	0,36±0,06*
CMS024	9	0,34±0,05*
CMS027	10	0,37±0,03*
CMS036	10	0,40±0,03*
Фізіологічний розчин	10	0,53±0,05

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS002, CMS008, CMS012, CMS014, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034 і CMS036 здатні збільшувати вагу вилочнової залози, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05). Встановлено, що серед даних пептидів CMS034

має статистично значущу відмінність з IL-2 групою (P<0,05). Також встановлено, що CMS002, CMS008, CMS012, CMS014, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS030, CMS032 і CMS036 мають статистично значущу відмінність як з IFN-γ групою, так і з IL-2 групою (P<0,05), як показано в таблиці 27.

Таблиця 27

Група	N	X±SD (%)
CMS002	10	0,21±0,02* [@] [^]
CMS008	10	0,20±0,04* [@] [^]
CMS012	10	0,26±0,02* [@] [^]
CMS014	10	0,21±0,02* [@] [^]
CMS016	10	0,20±0,03* [@] [^]
CMS018	10	0,23±0,02* [@] [^]
CMS019	10	0,20±0,03* [@] [^]
CMS020	10	0,27±0,03* [@] [^]
CMS022	10	0,30±0,03* [@] [^]
CMS023	10	0,20±0,02* [@] [^]
CMS024	10	0,27±0,02* [@] [^]
CMS026	10	0,27±0,02* [@] [^]
CMS027	8	0,21±0,03* [@] [^]
CMS028	10	0,18±0,04*
CMS029	9	0,18±0,05*
CMS030	10	0,25±0,04* [@] [^]
CMS032	10	0,27±0,03* [@] [^]
CMS033	9	0,18±0,03*
CMS034	8	0,19±0,04* [^]
CMS036	9	0,22±0,02* [@] [^]
IFN-γ	10	0,15±0,04
IL-2	9	0,14±0,04
Фізіологічний розчин	9	0,02±0,02

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, P<0,05

@ порівняння з IFN-γ групою P<0,05

^ порівняння з IL-2 групою P<0,05

Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день CMS008, CMS010 і CMS029 здатні знижувати вагу селезінки зі статистично значущою відмінністю з групою, яка

одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Докладні дані наведені нижче в таблиці 28.

Таблиця 28

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS008	10	$0,39 \pm 0,08^*$
CMS010	10	$0,38 \pm 0,05^*$
CMS029	10	$0,42 \pm 0,04^*$
IFN- γ	10	$0,50 \pm 0,04$
IL-2	9	$0,62 \pm 0,07$
Фізіологічний розчин	9	$0,53 \pm 0,05$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS001, CMS002, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS028, CMS029, CMS030, CMS32, CMS033, CMS034 і CMS036 здатні збільшувати вагу виличкової залози, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Встанов-

лено, що серед даних пептидів CMS002, CMS014, CMS024 і CMS030 мають статистично значущу відмінність з IL-2 групою ($P<0,05$). Також встановлено, що CMS010, CMS012, CMS018, CMS019, CMS020, CMS022, CMS026, CMS028, CMS032, CMS034 і CMS036 мають статистично значущу відмінність як з IFN- γ групою, так і з IL-2 групою ($P<0,05$), як показано в таблиці 29.

Таблиця 29

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS001	10	$0,22 \pm 0,05^*$
CMS002	9	$0,24 \pm 0,05^{*^{\wedge}}$
CMS010	9	$0,27 \pm 0,05^{*@^{\wedge}}$
CMS011	10	$0,22 \pm 0,04^*$
CMS012	10	$0,27 \pm 0,06^{*@^{\wedge}}$
CMS013	10	$0,21 \pm 0,05^*$
CMS014	10	$0,23 \pm 0,6^{*^{\wedge}}$
CMS015	9	$0,20 \pm 0,08^*$
CMS016	10	$0,22 \pm 0,06^*$
CMS018	10	$0,24 \pm 0,04^{*@^{\wedge}}$
CMS019	10	$0,24 \pm 0,02^{*@^{\wedge}}$
CMS020	10	$0,24 \pm 0,07^{*@^{\wedge}}$
CMS021	9	$0,20 \pm 0,06^*$
CMS022	9	$0,25 \pm 0,04^{*@^{\wedge}}$
CMS023	10	$0,23 \pm 0,06^*$
CMS024	9	$0,23 \pm 0,06^{*^{\wedge}}$
CMS026	10	$0,31 \pm 0,05^{*@^{\wedge}}$
CMS028	10	$0,28 \pm 0,06^{*@^{\wedge}}$
CMS029	10	$0,21 \pm 0,03^*$
CMS030	10	$0,23 \pm 0,07^{*^{\wedge}}$
CMS032	10	$0,29 \pm 0,04^{*@^{\wedge}}$
CMS033	10	$0,20 \pm 0,02^*$
CMS034	9	$0,27 \pm 0,06^{*@^{\wedge}}$
CMS035	10	$0,21 \pm 0,04^*$
CMS036	10	$0,25 \pm 0,04^{*@^{\wedge}}$
IFN- γ	10	$0,15 \pm 0,04$
IL-2	9	$0,14 \pm 0,04$
Фізіологічний розчин	9	$0,12 \pm 0,02$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою $P<0,05$

^ порівняння з IL-2 групою $P<0,05$

Встановлено, що в дозі 5мкг/кг/день CMS030 здатний збільшувати вагу селезінки, маючи статистично значущу відмінність з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Встановлено, що

CMS015 здатний знижувати вагу селезінки, маючи статистично значущу відмінність з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Докладні дані наведені нижче в таблиці 30.

Таблиця 30

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS015	9	$0,38 \pm 0,15^*$
CMS030	10	$0,64 \pm 0,09^*$
Фізіологічний розчин	10	$0,53 \pm 0,05$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS002, CMS008, CMS010, CMS012, CMS014, CMS018, CMS020, CMS022, CMS026, CMS028, CMS030 і CMS032 здатні збільшувати вагу вилочкової залози, виявляючи статистично значущу відмінність у порівнянні з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Встановлено, що серед

даних пептидів CMS008 і CMS012 мають статистично значущу відмінність з IL-2 групою ($P<0,05$). Також встановлено, що CMS002, CMS020 і CMS030 мають статистично значущу відмінність як з IFN- γ групою, так і з IL-2 групою ($P<0,05$), як показано в таблиці 31.

Таблиця 31

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS002	8	$0,26 \pm 0,06^{*@^{\wedge}}$
CMS008	10	$0,22 \pm 0,07^{*^{\wedge}}$
CMS010	9	$0,21 \pm 0,03^*$
CMS012	10	$0,22 \pm 0,06^{*^{\wedge}}$
CMS014	10	$0,20 \pm 0,04^*$
CMS018	10	$0,20 \pm 0,03^*$
CMS020	9	$0,23 \pm 0,05^{*@^{\wedge}}$
CMS022	10	$0,21 \pm 0,06^*$
CMS026	9	$0,21 \pm 0,05^*$
CMS028	10	$0,20 \pm 0,06^*$
CMS030	8	$0,24 \pm 0,05^{*@^{\wedge}}$
CMS032	10	$0,21 \pm 0,06^*$
IFN- γ	10	$0,15 \pm 0,04$
IL-2	9	$0,14 \pm 0,04$
Фізіологічний розчин	9	$0,12 \pm 0,02$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою $P<0,05$

^ порівняння з IL-2 групою $P<0,05$

Встановлено, що в дозі 0,5мкг/кг/день CMS020 здатний збільшувати вагу селезінки, маючи статистично значущу відмінність з групою, яка одержує фізіологічний розчин, IFN- γ групою і IL-2 групою ($P<0,05$). Встановлено, що CMS001 здатний зни-

жувати вагу селезінки при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P<0,05$). Докладні дані наведені нижче в таблиці 32.

Таблиця 32

Група	N	$\bar{X} \pm SD$ (%)
CMS001	10	$0,40 \pm 0,05^*$
CMS020	8	$0,68 \pm 0,09^{*@^{\wedge}}$
IFN- γ	10	$0,53 \pm 0,05$
IL-2	10	$0,50 \pm 0,04$
Фізіологічний розчин	10	$0,62 \pm 0,07$

* порівняння з групою, яка одержує фізіологічний розчин, $P<0,05$

@ порівняння з IFN- γ групою $P<0,05$

^ порівняння з IL-2 групою $P<0,05$

На закінчення, автори даного винаходу виявили, що пептиди CMS001, CMS002, CMS003, CMS007, CMS008, CMS009, CMS010, CMS011, CMS012, CMS013, CMS014, CMS015, CMS016, CMS018, CMS019, CMS020, CMS021, CMS022, CMS023, CMS024, CMS026, CMS027, CMS028, CMS029, CMS030, CMS032, CMS033, CMS034, CMS035 і CMS036 володіють біологічною активністю *in vivo* на протестованих тваринних моделях.

II. Антивірусна дія пептидів *in vivo*

Для того, щоб встановити, чи володіють дані пептиди можливою терапевтичною дією на вірусні інфекції, автори даного винаходу використали в такому дослідженні тваринну модель качинового гепатиту В для того, щоб вивчити вплив вищезгаданих пептидів *in vivo* на хворих тваринах.

Одержували модель гепатиту В у качок Chongqing, яку обробляли пептидами за допомогою внутрішньоочеревинних ін'єкцій (50мкг/кг/день, один раз на день) протягом 4 тижнів.

Аналізували рівень DHBV ДНК гібридизацією сироватки методом дот-блотингу. Обробку ламівудином і звичайним фізіологічним розчином використовували як позитивний і негативний контроль, відповідно. Встановлено, що пептид CMS001 здатний знижувати рівень DHBV ДНК в сироватці крові на 4-ий тиждень обробки при статистично значущій відмінності з контрольною групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Можна зробити висновки, що CMS001 при відповідному рівні дозування можна використати як частину або сам по собі для лікування інфекції вірусного гепатиту.

Матеріали і методи

1. Пептиди були синтезовані звичайним чином American Peptide company, Inc., США, з L-амінокислот.

2. Тваринна модель ^[1]

Качкам Chongqing у віці одного дня інокулювали за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 0,1мл вихідної сироватки позитивної за ДНК вірусу качинового гепатиту В (DHBV) (5×10^7 копій/мл). Через тиждень збирали зразки крові із зовнішньої яремної вени і підтверджували інфікування гібри-

дизацією методом дот-блотингу з використанням DHBV ДНК зонда, міченого дигоксином^[2]. Качок вирощували до 2 тижневого віку для початку дослідження.

3. Розподіл на групи і обробка

DHBV інфікованих качок розбивали випадковим чином на наступні групи

а) Група негативного контролю (n=9): Звичайний фізіологічний розчин вводили один раз на день 1мл на качку один раз на день.

б) Група ламівудину (n=8): Як група позитивного контролю. Ламівудин^[4] давали в дозі 50мг/кг/день шляхом перорального введення один раз на день

с) Пептидна група (n=9): 50мкг/кг/день пептиду (доводили до кінцевого об'єму 0,5-1мл звичайним фізіологічним розчином) вводили один раз на день за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції.

Обробку продовжували протягом 4 тижнів і спостереження продовжували ще протягом одного тижня після закінчення обробки. Зразки крові об'ємом 1мл відбирали із зовнішньої яремної вени качок в дні 0, 7, 14, 21, 28 і 35 після початку обробки. Сироватку зі зразків крові відразу ж виділяли^[3] і зберігали при -20°C до аналізу.

4. Визначення рівня DHBV ДНК в сироватці.

DHBV ДНК зонд був флуоресцентно мічений відповідно до протоколу набору міток від виробника набору (Amersham Pharmacia Biotech Co.). 40мкл качиною сироватки крові піддавали дот-блотингу (1 дублікатна пляма на зразок) на нітроцелюлозній мембрані і гібридизували флуоресцентно-міченим DHBV ДНК зондом для кількісного визначення^[2]. Після завершення гібридизації блоти проявляли в CDP-Star флуориметричному реагенті RPN2690 і сканували з використанням сканера Vuego Scan (Brisa-620st). Програмне забезпечення ImageMaster TotalLab v.1.1.lnk використовували для кількісного аналізу блотів. Статистичний аналіз проводили відповідно до парного t-тесту з використанням програмного забезпечення SPSS.

Результати

Таблиця II. 1

Титр DHBV ДНК в сироватці крові перед і після обробки

Рівень DHBV ДНК (середнє значення \pm стандартне відхилення, 10^3 одиниць)						
	0 день	7 день	14 день	21 день	28 день	35 день
Звичайний фізіологічний розчин	26 \pm 12	45 \pm 31	49 \pm 23	102 \pm 66	60 \pm 38	50 \pm 43
Ламівудин	21 \pm 9	6 \pm 4*	7 \pm 6*	8 \pm 7*	8 \pm 5*	20 \pm 19
CMS001	21 \pm 18	11 \pm 13	20 \pm 18	14 \pm 4	5 \pm 3*	18 \pm 16

Парний t-тест, порівняння з 0 вдень для тих же тварин: * $P < 0,05$

Негативна (звичайний фізіологічний розчин) і позитивна (ламівудин) контрольні групи підтверджують успішне створення тваринної моделі гепатиту. Встановлено, що в дозі 50мкг/кг/день пептид CMS001 здатний знижувати титр DHBV ДНК в сироватці крові через 4 тижні обробки при статистично значущій відмінності ($p < 0,05$) зі значенням для тих же тварин перед обробкою. Після закінчення

обробки титр DHBV ДНК в сироватці крові повертався до значення, що не має статистичної відмінності зі значенням до обробки, показуючи, що дія пептиду CMS001 може бути оборотною і/або необхідний більш тривалий період обробки для придушення вірусу.

Обговорення

Тваринна модель качинового гепатиту^[1] являє

собою розроблену модель для дослідження патогенезу гепатиту В у людини і для скринінгу терапевтичних агентів для лікування гепатиту В. В даному дослідженні встановлено, що CMS001 здатний знижувати титр ДНВВ ДНК в сироватці крові після 4 тижнів обробки, вказуючи, що пептид CMS001 при відповідному рівні дозування і при відповідній схемі застосування може бути корисний сам по собі або в поєднанні з іншими речовинами як агент для лікування гепатиту В у людини.

В даному дослідженні тестували введення за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції, але це не виключає можливої ефективності пептиду при його введенні іншими альтернативними шляхами. Пептиди також можна вводити шляхом внутрішньовенної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, підшкірної ін'єкції і підшкірної імплантації, з використанням або без використання пристрою, що полегшує доставку лікарського засобу, такого як ліпосоми, захист для уповільненого вивільнення і т.д. Пептид також можна вводити в будь-якій формі для перорального введення, такий як таблетка, капсула, суспензія, розчин і т.д. у відповідній формі без модифікації або у вигляді форми з уповільненим вивільненням, або з використанням або без використання шлунково-кишкового захисту. Крім того, пептид можна використати у будь-якій формі для місцевого застосування, такий як мазь, крем, гель і т.д., з використанням або без використання пристрою, що полегшує черезшкірне проникнення, або у вигляді інгаляції порошку у розчиненому або ліпосомно-захищеному вигляді. Пептид також може бути переведений в його генетичну послідовність і клонований в систему експресії, або сам по собі або в поєднанні з іншими пептидними послідовностями, для утворення кінцевої пептидної молекули для використання активності пептидів, як описано в даному винаході, з очищенням або без очищення кінцевого пептиду.

Таблиця II.2

Вплив пептидів на гепатит В

Код CMS	SEQ ID No
CMS001	1

Список літератури:

1. Chen Yaxi, Guo shuhua, Zhang Dingfeng, et al. Foundation and application of Chongqing duck hepatitis B model. Chinese Journal of Hepatology. 1993; 1(2): 89-91
2. Chen Yaxi, Guo shuhua, Chen Xuehua. Preparation and application of DHBV DNA probe labeled with digoxin. Journal of Chongqing University of Medical Sciences. 1994; 19(4): 295-297
3. Tang Ni, Huang Ailong, Guo shuhua, et al. Systemic foundation and application of serological parameters of humoral immunity to duck hepatitis B virus. Chinese Journal of Hepatology. 2001; 9(1): 13-15
4. Chen Yaxi, Guo shuhua, Qi Zhenyuan, et al. An experimental study of lamivudine against duck hepatitis B virus in combination with famciclovir. Chinese Journal of Hepatology. 2001; 9(4): 209-211

III. Вплив пептидів на нефрит

Для того, щоб з'ясувати, чи володіють ці пептиди можливою терапевтичною дією на нефрит, автори даного винаходу використали в такому дослідженні тваринну модель Масугі (Masugi) нефриту у щурів, для того, щоб протестувати *in vivo* вплив вищезгаданих пептидів на хворих тваринах^[3,4].

Задача даного дослідження полягала у вивченні терапевтичного ефекту пептидів *in vivo* на хронічний гломерулонефрит. Щурячу модель нефриту Масугі створювали за допомогою ін'єкції кролячого IgG антищурячої-ниркоподібної кіркової речовини здоровим щурам Sprague Dawley, а потім негайно вводили їм внутрішньоочеревинно ін'єкцію пептидів в дозі 50мкг/кг/день один раз на день протягом 3 тижнів. Як позитивний контроль використали гідрокортизон. Встановлено, що протеїнурія, рівень креатиніну в сироватці крові та індекс селезінки у щурів, оброблених CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036, були нижчими у порівнянні з контрольною групою при статистичній значущості ($p < 0,05$). Патологоанатомічне дослідження під мікроскопом нирки показало, що терапевтична дія даних пептидів була аналогічна обробці гідрокортизоном. Можна зробити висновок, що CMS014, CMS01, CMS030 і CMS036 можна використати як засіб для лікування хронічного нефриту.

Матеріали.

Щури Sprague Dawley (SD), самці, вагою 120±20г, одержані з Центра експериментальних тварин Університету Гуаньчжоу Традиційної китайської медицини (Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine), а також Першого Військово-медичного університету. Кролики породи «шиншила», вагою 3кг, одержані з Центра експериментальних тварин Університету Гуаньчжоу Традиційної китайської медицини.

Пептиди, що походять з L-амінокислот, були синтезовані звичайним чином American Peptide Company, Inc., США і розведені до концентрації 10мкг/мл стерильним звичайним фізіологічним розчином. Гідрокортизон одержаний від Yangzhou Pharmaceutical Factory, Китай.

Набір для визначення рівня креатиніну від Shanghai Rongsheng Biological technique Company, КНР.

Методи:

1. Одержання кролячої антисироватки антищурячої-ниркоподібної кіркової речовини^[1]. 20 здорових щурів SD анестезували за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 3%-ного пентобарбіталу натрію, 40мг/кг. Черевну аорту розкривали і нирки заливали звичайним фізіологічним розчином доти, доки вони не ставали чистими від крові. Виділяли ниркоподібну кіркову речовину, гомогенізували в 5 об'ємах 0,01М буфера Tris-HCl, pH 8,1, і фільтрували через сито з нержавіючої сталі 140 калібру. Фільтрат збирали і змішували або з доповненим GIBCO-RPE, або з неповним ад'ювантом Фрейнда (Freund) у співвідношенні 1:1 і емульгували, одержуючи робочий імунізуючий розчин.

10 здорових кроликів імунізували імунізуючим розчином, в перший раз з використанням повного

ад'юванта Фрейнда, а потім неповного. Антиген вводили гіподермальною ін'єкцією через 6 вибраних випадковим чином точок по 0,1мл на точку один раз на 10 днів. Через 6 тижнів збирали кров з вушної вени і визначали титр антитіла методом подвійної дифузії^[2]. Через 8 тижнів після початку імунізації кроликів анестезували за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 3%-ного пентобарбіталу натрію, 20мг/кг і збирали кров з сонної артерії. Потім антисироватку проціджували і виділяли.

Цільну кров збирали у 15 здорових SD щурів. Виділяли еритроцити і тричі промивали дочиста звичайним фізіологічним розчином. Чисті еритроцити змішували з 250мл кролячої антисироватки та інкубували при 4°C протягом ночі. Після інкубації еритроцити видаляли центрифугуванням і супернатант додатово інактивували при 56°C протягом 30 хвилин. Після центрифугування для видалення якого-небудь осаду з супернатанту виділяли неочищений IgG і частково очищали, тричі осаджуючи (NH₄)₂SO₄ (50%, 33% і потім 33%)^[5]. Неочищений IgG повторно розчиняли в 125мл двічі дистильованої води і проводили очищення діалізом сульфатом амонію. Титр антитіла антищурячої-ниркоподібної кіркової речовини визначали методом подвійної дифузії^[2].

2. Індукція гломерулонефриту у щурів^[5]: 0,25мл затравкового розчину (містить приблизно 4мг неспецифічного кролячого IgG з повним ад'ювантом Фрейнда) вводили за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції здоровим SD щурам для примування щурів за п'ять днів перед індукцією. За винятком нормальної здорової контрольної групи, яка одержувала звичайний фізіологічний розчин, всі групи згодом індукували за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 1мл кролячої IgG антищурячої-ниркоподібної кіркової речовини, одержаної, як описано в розділі «Метод 1».

3. Розподіл на групи і введення: самців SD щурів випадковим чином розділяли на наступні групи: нормальна здорова контрольна група, контрольна нефритна група з обробкою плацебо (плацебо), нефритна група з обробкою пептидом і контрольна нефритна група з обробкою гідрокортизоном (гідрокортизон), 12 тварин на групу. Обробку починали в день індукції. Пептиди - 50мкг/кг/день, гідрокортизон 3,3мг/кг/день і звичайний фізіологічний розчин використовували як плацебо, у всіх випадках введення проводили внутрішньоочеревинно, один раз на день протягом 3 тижнів.

4. Параметри, що контролюються^[4].

(а) рівень білка в сечі: кожного щура утримували в індивідуальній клітці. Забезпечували адекватною водою для питва. Сечу збирали один раз на тиждень протягом 24 годин. Вміст білка в сечі визначали за методом кумасину синього.

(b) рівень креатиніну в сироватці крові: кров збирали через три тижні обробки і проводили визначення рівня креатиніну в сироватці крові. Набір для креатиніну одержаний від Shanghai Rongsheng Biological Technique Company.

(c) Індекс ваги селезінки: індекс ваги селезінки визначали за наступною формулою:

Індекс ваги селезінки = середня вага селезінки ÷ середня вага тіла

(d) Патологічне мікроскопічне дослідження нирки: для патологічного дослідження в кожній групі вибирали 6 найбільш важких нирок

Статистичний аналіз:

Використали t-тест для порівнянь між групами, відділяли набір при $p < 0,05$. Для всіх груп двох щурів з найбільш низькими значеннями білка в сечі виключали з статистичного аналізу. Результат 1. Вплив обробки пептидом на рівень білка в сечі

Таблиця III.1.

Вплив обробки пептидом на рівень білка в сечі (одиниці:мг)

Групи	n	Тиждень 1	Тиждень 2	Тиждень 3
CMS014	10	5,5±4,0*	6,3±6,8*	2,8±1,9*
CMS018	10	7,0±3,7*	5,5±7,9*	3,3±3,4*
CMS030	10	5,4±3,4*	9,5±16,2	2,4±1,5*
CMS036	10	7,9±5,8*	5,0±7,1*	1,3±0,9*
Гідрокортизон	10	3,1±2,0*	7,5±7,7	7,6±7,1*
Плацебо	10	22,9±22	17,2±14,5	20,2±29
Нормальна	9	1,7±1,3*	2,3±1,1*	0,4±0,2*

Порівняння з плацебо, * $p < 0,05$

Встановлено, що пептиди CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036 в дозі 50мкг/кг/день один раз на день здатні знижувати рівень білка в сечі в щурячій моделі нефриту Masugi при статистично значущій відмінності з контрольною групою, яка одержує обробку плацебо. Також зазначено, що швидкість росту в групах CMS014, CMS030 і

CMS036 і гідрокортизону була нижче звичайної швидкості росту. Швидкість росту в групі гідрокортизону знижувалась до такої міри, що після першого тижня доза обробки була скорочена наполовину для того, щоб виключити важку непереносимість.

2. Вплив обробки пептидом на рівень креатиніну в сироватці крові

Таблиця III.2.

Вплив пептидів на рівень креатиніну в сироватці крові

Групи	n	Рівень креатиніну у сироватці крові (мкмоль/л)
CMS014	10	159±1
CMS018	10	67±1*
CMS030	10	93±1*
CMS036	10	80±1*
Плацебо	10	265±212
Гідрокортизон	10	239±107
Нормальна	9	80±1*

Порівняння з щурами, хворими нефритом, що одержували обробку плацебо (плацебо), * $p < 0,05$

Рівень креатиніну у щурів з нефритом Masugi, що одержували обробку плацебо, був набагато вище рівня в нормальній контрольній групі, демонструючи, що ниркоподібна функція у щурів з нефритом була аномальною. Встановлено, що пептиди CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036 в дозі 50мкг/кг/день один раз на день здатні знижувати рівень креатиніну при статистично значущій відмінності з щурами, страждаючими нефритом, при обробці плацебо.

3. Вплив пептидів на індекси селезінки

Таблиця III.3

Вплив пептидів на індекс селезінки ($\times 10^{-3}$)

Групи	n	Індекс селезінки
CMS014	10	3,6±1,3*
CMS018	10	3,3±0,8*
CMS030	10	3,0±0,5*
CMS036	10	3,4±0,8*
Плацебо	10	4,8±1,1
Гідрокортизон	10	4,5±1,4
Нормальна	9	2,4±0,1*

Порівняння з щурами, хворими нефритом, що одержували обробку плацебо (плацебо), * $p < 0,05$

Селезінка всіх індукованих щурів була збільшена у порівнянні зі звичайними щурами, показуючи, що індукція нефриту пов'язана з імунною реакцією у відповідь. Встановлено, що пептиди CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036 в дозі 50мкг/кг/день один раз на день здатні знижувати індекс селезінки при статистично значущій відмінності з щурами, страждаючими нефритом, при обробці плацебо, $p < 0,05$. На цій основі передбачається, що пептиди можуть надавати коректуючу дію відносно нефриту за допомогою імуносупресорного (імунопридувального) механізму.

4. Вплив пептидів на патологічне мікроскопічне дослідження нирки

При порівнянні зі звичайними щурами щури, які страждають нефритом, при обробці плацебо (група плацебо) продемонстрували ознаки утво-

рення фіброзної тканини в клубочковій капсулі, гіперплазії епітелію клубочків, утворення наростання, розширення і закупорювання капілярів клубочків, набряку подовжніх канальців епітелію і утворення викривлення в периферичному канальці і збираючому протоці. Такі патологічні зміни підтвердили успішне індукування нефриту. Спостерігали, що в групі CMS014 був тільки один щур, що мав ознаки утворення фіброзної тканини в клубочковій капсулі і гіперплазії епітелію клубочків. Інші параметри для того ж щура і для інших щурів в тій же групі мали по суті таку ж гістологію нирки, що і звичайні щури. У групах CMS018, CMS030 і CMS036 всі патологічні параметри для всіх щурів були в межах норми.

Висновок

Можна зробити висновок, що пептиди CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036 в дозі 50мкг/кг/день один раз на день при внутрішньо-очеревинному введенні можуть надавати терапевтичну дію в експериментальній щурячій моделі Masugi нефриту. Протеїнурія, виділення креатиніну і гістологія нирки коригувались даними пептидами в групі, що обробляється, при статистично значущій відмінності з контрольною групою, яка одержує обробку плацебо. Дані пептиди можуть діяти за допомогою імунологічного механізму, на що вказує їх вплив на індекс ваги селезінки, але не можна виключати можливість їх дії за допомогою інших механізмів.

Обговорення

Пептиди CMS014, CMS018, CMS030 і CMS036 можуть використовуватись як частина або самі по собі для лікування нефриту у людини. Наприклад, пептиди можна використати для корекції протеїнурії або для відновлення видільних функцій у хворих нефритом. Пептиди також можна використати для профілактики подальшого погіршення функції нирок у хворих нефритом. Пептиди можна використати самі по собі або у вигляді комбінації двох або більше пептидів, або в комбінації з іншими фармацевтичними засобами або харчовими домішками, як повний курс лікування нефриту.

Таблиця III.4.

Вплив пептидів на нефрит

Код CMS	SEQ ID No
CMS014	7
CMS018	10
CMS030	21
CMS036	26

Список літератури

1. SDA (State Drug Administration, P.R. China). The guideline of preclinical researches of new drugs. 1994, the 1st edition, Page 96.
2. Xu Shuyun, et al. The methodology of pharmacological experiment, the People's Sanitation Publishing Company, Beijing, the 2nd edition, 1991:1071.
3. Chen Qi, et al. The methodology of pharmacological researches of traditional Chinese medicine, the People's Sanitation Publishing

Company, Beijing, the 1st edition. 1993:390.

4. Du Guanhua. The guideline for pharmacological experiment the discovery and pharmacological evaluation of new drugs, Science Publishing Company, Beijing, the 1st edition, 2001:598.

5. Wang Shuxian. Nephrology, the People's Sanitation Publishing Company, Beijing, the 11th edition, 1987:244.

IV. Вплив CMS пептидів на рак

Для того, щоб встановити, чи є дані пептиди лікарськими засобами для раку, автори даного винаходу використали різні стандартні тваринні моделі раку в такому дослідженні для вивчення біологічної дії вищезгаданих пептидів на хворих тварин.

Матеріали

1. Експериментальні тварини

Миші BALB/c, C57BL/6 і DBA/2, вагою 18-22г з Інституту медичних наук Китаю (China Medical Science Institute), КНР.

2. Клітинні лінії

Клітини мишачої саркоми S₁₈₀, клітини B₁₆ і клітини L₁₂₁₀ з Департаменту досліджень раку Інституту медичних наук Китаю (Cancer Research Department, China Medical Science Institute).

Клітини YAC-1 надані в дарунок професором Yao Zhi, медичного університету Тяньджину (Tianjin Medical University).

3. Основні лікарські засоби і реагенти

Пептиди, використані в даному аналізі, були вироблені звичайним чином American Peptide Company, Inc., США.

Плодова теляча сироватка, RPMI-1640 клітинне культуральне середовище від Gibco, США.

MTT, ConA від Sigma, США.

Рекомбінантний мишачий інтерферон-γ (rmIFN-γ) від Beijing Biotech Inc., Китай.

Рекомбінантний інтерлейкін-2 людини (rhIL-2) від Shanghai Huaxin Biotech Inc., Китай.

Розчин для відділення лімфоцитів, Науково-дослідний інститут Гематологічних захворювань, Національний інститут медичних наук, КНР.

Циклофосфамід одержаний від 12-ї фармацевтичної фабрики Шанхая, КНР.

Методи

1. Введення досліджуваних речовин

Внутрішньоочеревинна ін'єкція, один раз на день. За винятком групи циклофосфаміду у всіх групах починали обробку за 5 днів перед трансплантацією ракових клітин. Групу циклофосфаміду починали обробляти на наступний день після трансплантації ракових клітин. Обробку всіх груп досліджуваними речовинами проводили протягом 30 днів або доти, доки тварина не вмирала, якщо не вказано іншого.

2. Вплив пептидів на швидкість росту трансплантованих клітин саркоми S₁₈₀ у мишей BALB/c і на імунологічну функцію хазяїна.

Мишей BALB/c випадковим чином розподіляли на пептидну групу, групу циклофосфаміду, групу rmIFN-γ, групу rhIL-2 і групу фізіологічного розчину, 20 тварин на групу.

Вихідні клітини саркоми S₁₈₀ інкубували в середовищі DMEM/F12, доповненому 10% феталь-

ною телячою сироваткою, 37°C, 5% CO₂ протягом 72 годин, потім промивали 3-4 рази розчином Хенка (Hank) при кімнатній температурі. Концентрацію клітин доводили до 1-2x10⁹ на літр розчином Хенка. 0,2мл клітинної суспензії імплантували декільком мишам BALB/c в пахву протягом 10-12 днів. Мишей вбивали зміщенням шийного хребця. Пухлинні маси, що інтенсивно зросли і не зруйновані, збирали і промивали дочиста стерильним фізіологічним розчином. Тканину диспергували у фізіологічному розчині до гомогенної клітинної суспензії у співвідношенні 1г тканини на 4мл фізіологічного розчину. Мишачу модель саркоми одержували ін'єкцією 0,2мл клітинної суспензії через пахву^[1]. Введення досліджуваної речовини починали, як описано в розділі «Метод 1».

2.1. Вплив пептидів на фагоцитарну функцію моноядерного фагоцита у мишей з саркомою S₁₈₀ [2,3] аналізували шляхом ведення туші в хвостову вену з розрахунку 0,1мл/10г ваги тіла (розведення 1:5 звичайним фізіологічним розчином) на другий день після останнього введення досліджуваної речовини. Через одну хвилину і п'ять хвилин після ін'єкції туші відбирали 20мкл крові з кута очної щілини за допомогою гепаринізованої трубки. Кров змішували з 2мл 0,1% вага/об. Na₂CO₃ і потім одержували ОЩ_{680nm}. Основний явний індекс К розраховували за наступною формулою:

$$K = (lg A_1 - lg A_2) + (t_2 - t_1)$$

Ключ:

A1: ОЩ_{680nm} на першій хвилині

A2: ОЩ_{680nm} на п'ятій хвилині

t2: 5 хвилин

t1: 1 хвилинка

Потім після дослідження фагоцитарного індексу мишу вбивали шляхом зміщення шийного хребця. Печінку, селезінку і ракові тканини висікали, промокали досуха і зважували.

Фагоцитарний індекс а розраховували, як показано нижче:

$$\alpha = \left(\sqrt[3]{K} \right) \times (W \div W_{LS})$$

Ключ:

W: вага тіла

W_{LS}: вага печінки і селезінки

2.2. Індекс інгібування росту пухлини розраховували за наступною формулою:

Індекс інгібування росту пухлини = (середня вага пухлини в контрольній групі - середня вага пухлини в групі обробки) ÷ середня вага пухлини в контрольній групі.

3. Вплив пептидів на виживання BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу

Мишей BALB/c випадковим чином розподіляли на пептидну групу, групу циклофосфаміду, групу rmIFN-γ, групу rhIL-2 і групу фізіологічного розчину, 20 тварин на групу.

Вихідні клітини H₂₂ інкубували в середовищі DMEM/F12, доповненому 10% фетальною телячою сироваткою, 37°C, 5% CO₂ протягом 72 годин, потім промивали 3-4 рази розчином Хенка (Hank) при кімнатній температурі. Концентрацію клітин доводили до 1-2x10⁹ на літр розчином Хенка. 0,2мл клітинної суспензії імплантували декільком

мишам BALB/c в черевну порожнину на 6-8 днів^[1]. Мишей вбивали зміщенням шийного хребця. Асцитичну рідину мишей збирали асептичним чином і концентрацію клітин доводили до 1×10^6 на мл розчином Хенка. 0,2мл клітинної суспензії імплантували в черевну порожнину здорових мишей для одержання мишачої моделі, що несе H₂₂, рак печінки асцитичного рідинного типу. Введення досліджуваної речовини починали, як описано в розділі «Метод 1». Записували дані із виживання мишей. Якщо тварина жила довше, ніж продовжувався експеримент, дні виживання записували як тривалість експерименту. Середній день виживання одержували за допомогою методу Каплана-Мейєра в опції «Виживання» програмного забезпечення SPSS. Індекс виживання розраховували згідно з наступною формулою:

Індекс виживання = (середнє число днів виживання в групі обробки - середнє число днів виживання контрольної групи) ÷ середнє число днів виживання контрольної групи × 100%

4. Вплив пептидів на клітинний імунітет BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу

4.1. Одержання суспензії клітин селезінки^[1,4]

Здорових мишей BALB/c випадковим чином розподіляли на пептидну групу, групу rmlFN-γ, групу rhIL-2 і групу фізіологічного розчину, 15 мишей на групу і одержували мишачу модель, що несе H₂₂, як описано в розділі «Метод 3». Після імплантації ракових клітин речовини, що тестуються, вводили протягом 15 днів, мишей вбивали зміщенням шийного хребця. Селезінку відділяли і вручну диспергували в холодному розчині D-Hank з використанням голки для ін'єкцій. Дисперговану клітинну суспензію додатково пропускали через сито 100 калібру з нержавіючої сталі діаметром 150мкм. Після центрифугування при 200g протягом 10 хвилин супернатант відкидали. Осад клітин повторно суспендували в 10 об'ємах буфера Tris-NH₄Cl і потім залишали на 10 хвилин при кімнатній температурі. Суспендування клітини збирали центрифугуванням при 150g протягом 10 хвилин. Клітини промивали 2-4 рази холодним розчином D-Hank шляхом ресуспендування і центрифугування при описаних вище умовах. Промиті клітини потім розводили до бажаної щільності клітин з використанням культурального середовища RPMI-1640, що містить 10% фетальної телячої сироватки.

4.2. Вплив пептидів на трансформацію Т-лімфоцитів у мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу^[1,4]

Клітини селезінки щільністю 1×10^6 мл вмішували в 96-ямові планшети для клітинних культур, 100мкл/ямку, три паралельних ямки для кожного зразка, що аналізується, і контрольний зразок для кожної миші. У ямки, що аналізуються, додавали 100мкл/ямку ConA розчину 100мкг/мл в RPMI-1640 і 100мкл/ямку самого середовища RPMI-1640 використовували для контролю. Клітини інкубували протягом 66 годин при 37°C, 5% CO₂. Клітини потім осаджували центрифугуванням при 150g протягом 10 хвилин. Супернатант збирали і зберігали при -20°C для визначення цитокінів IL-2 і IFN.

50мкл/ямку МТТ розчину 1мг/мл в RPMI-1640 додавали до осаду клітин і клітини повторно суспендували струшуванням протягом 2 хвилин. Інкубацію продовжували протягом 4 годин. Супернатант відкидали після центрифугування при 150g протягом 10 хвилин. 120мкл 40мм HCl в пропанолі-2 додавали до осаду клітин і струшували протягом 3 хвилин. Використали рідер ELISA для одержання ОЩ_{570nm} для кожної ямки, нормованої для 630nm.

Для кожної миші формували три ямки, що аналізуються, і три контрольних ямки. Індекс стимуляції (SI) для кожної миші одержували, спочатку одержуючи середню ОЩ для трьох паралельних ямок, а потім ділячи значення для ямок, що аналізуються, на значення для контрольних ямок.

4.3. Вплив пептидів на NK клітинну активність у мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу^[5,6]

Одержували мишачі клітини селезінки щільністю 4×10^6 мл, як описано вище в розділі 4.1. Клітини-мішені YAC-1 брали у логарифмічній фазі і доводили до 1×10^5 мл. З використанням 96-ямових планшетів для культур клітин 100мкл клітин мишачої селезінки і 100мкл культурального середовища додавали в контрольну ямку, що містить тільки клітини селезінки; 100мкл клітин-мішеней і 100мкл культурального середовища додавали в контрольну ямку, що містить тільки клітини-мішені; 100мкл клітин мишачої селезінки і 100мкл клітин-мішеней додавали в ямки для аналізу NK активності. Готували три паралельних серії вищезгаданих ямок на мишу.

Зразки центрифугували при 150g протягом 10 хвилин для того, щоб зібрати клітини. Супернатант відкидали і додавали 50мкл/ямку МТТ розчину 1мг/мл. Реакційну суміш потім струшували протягом 2 хвилин та інкубували при 37°C, 5% CO₂ протягом 4 годин. Супернатант відкидали після центрифугування при 150g протягом 10 хвилин. Додавали 120мкл 40мм HCl в пропанолі-2 і струшували протягом 3 хвилин. Рідер ELISA використали для одержання ОП_{570nm} для кожної ямки, нормованої для 630nm.

Для кожної миші було 9 ямок: три ямки з клітинами селезінки - тільки контроль, три з клітинами-мішенями - тільки контроль і три ямки, що аналізуються, як з клітинами селезінки, так і з клітинами-мішенями. Індекс NK клітинної активності для кожної миші одержували, спочатку одержуючи середню ОЩ для трьох паралельних ямок кожної комбінації, потім використовуючи таку середню ОЩ в наступній формулі:

Індекс NK клітинної активності = $[1 - (\text{середня ОЩ ямки з клітинами селезінки і клітинами-мішенями} - \text{середня ОЩ ямки тільки з клітинами селезінки}) \div (\text{середня ОЩ ямки тільки з клітинами-мішенями})] \times 100\%$

5. Вплив пептидів на виживання DBA/2 мишей з трансплантованим L₁₂₁₀ лейкозом

Мишей DBA/2 випадковим чином розподіляли на пептидну групу, групу циклофосфаміду, групу rmlFN-γ, групу rhIL-2 і групу фізіологічного розчину, 20 тварин на групу.

Вихідні клітини L₁₂₁₀ інкубували в DMEM/F12

середовищі, доповненому 10% фетальною телячою сироваткою, 37°C, 5% CO₂ протягом 72 годин, потім промивали 3-4 рази розчином Хенка і доводили до 1x10⁵ клітин на літр. 0,1мл суспензії клітин імплантували в черевну порожнину декільком здоровим мишам DBA на 6-8 днів. Потім мишей вбивали зміщенням шийного хребця і збирали асцитичним чином їх асцитичну рідину. Концентрацію клітин в зібраній асцитичній рідині доводили до 1x10⁶ на мл розчином Хенка. 0,1мл клітинної суспензії імплантували кожній з тест-тварин і реєстрували дані з виживання тварин. Обробку починали, як описано в розділі «Метод 1». Середній день виживання одержували за допомогою методу Каплана-Мейєра в опції «Виживання» програмного забезпечення SPSS. Якщо тварина жила довше, ніж продовжувався експеримент, дні виживання записували як тривалість експерименту. Індекс виживання розраховували згідно з наступною формулою:

Індекс виживання = (середнє число днів виживання в групі обробки - середнє число днів виживання контрольної групи) ÷ середнє число днів виживання контрольної групи

6. Вплив пептидів на гуморальний імунітет мишей C₅₇BL/6, що несуть трансплантовану B₁₆ меланому, і на метастатичну здатність інокульованих клітин меланоми

Мишей C₅₇BL/6, вік 6-8 тижнів, вага 18-22г, випадковим чином розподіляли на пептидну групу, групу циклофосфаміду, групу rmiFN-γ, групу rhIL-2 і групу, що одержує фізіологічний розчин, 20 тварин на групу.

Вихідні клітини B₁₆ мишачої меланоми інкубували в середовищі DMEM/F12 доповненому 10% фетальною телячою сироваткою, 37°C, 5% CO₂ протягом 72 годин, потім промивали 3-4 рази розчином Хенка. Концентрацію клітин доводили до 1x10⁵ клітин на літр і 0,1мл суспензії клітин вводили ін'єкцією в хвостову вену мишам, що тестуються, для одержання тваринної моделі B₁₆ меланоми [7,8]. Обробку досліджуваною речовиною починали, як описано в розділі «Метод 1».

6.1. Вплив пептидів на гуморальний імунітет мишей C₅₇BL/6, що несуть трансплантовану B₁₆ меланому^[9]

Одержували еритроцити овець (SRBC), збираючи кров з шийної вени і вміщуючи її в стерильну колбу зі скляними кульками. Колбу струшували протягом 3 хвилин і потім кров змішували з розчином Альзевера (Alsever) (глюкоза 2,05г, NaCl 0,4г, лемонад Na 0,8г, доводили до 100мл дистильованою водою) і зберігали при 4°C. Безпосередньо перед використанням зразки центрифугували при

130g протягом 5 хвилин, збираючи SRBC. Клітини двічі промивали ресуспендуванням і центрифугуванням у нормальному фізіологічному розчині. Потім осад клітин збирали центрифугуванням при 180g протягом 10 хвилин і повторно суспендували у фізіологічному розчині, одержуючи кінцеву робочу суспензію SRBC, 2% (об./об.).

Комплемент одержували, додаючи 10 об'ємів свіжої сироватки крові морської свинки до одного об'єму ущільненого на центрифугу SRBC, і потім обережно струшуючи протягом 30 хвилин при 4°C. SRBC видаляли центрифугуванням при 200g протягом 10 хвилин. Для одержання робочого комплементного розчину додавали 10 об'ємів звичайного фізіологічного розчину.

Тваринам, що тестуються, на 27-й день обробки речовиною, що тестується, вводили 0,2мл робочої суспензії клітин SRBC кожній тварині для індукування антитіл. Через день після останнього введення досліджуваної речовини збирали кров з кута очної щілини і залишали при кімнатній температурі на одну годину для ексудації сироватки крові. Після центрифугування при 200g протягом 10 хвилин зібрану сироватку крові розводили в 500 разів з використанням звичайного фізіологічного розчину.

До 1мл розведеної мишачої сироватки крові для кожної миші додавали 0,5мл суспензії SRBC. Охолоджували на льоду. Потім додавали 1мл робочого розчину комплементу та інкубували при 37°C на водяній бані протягом 10 хвилин. Реакцію зупиняли охолодженням льодом. Потім зразки центрифугували при 200g протягом 10 хвилин, одержуючи супернатант.

До 1мл даного супернатанту додавали 3мл розчину Драбкіна (Drabkin) і залишали при кімнатній температурі на 10 хвилин. Одержували ОЩ_{540nm}.

Стандартизовану ОЩ_{540nm} одержували, змішуючи 0,25мл суспензії SRBC з розчином Драбкіна до 4мл і залишаючи суміш на 10 хвилин перед одержанням ОЩ_{540nm}.

Індекс гемолізу = (ОЩ_{540nm} зразка, що тестується ÷ стандартизована ОЩ_{540nm}) x 500

6.2. Після дослідження гуморального імунітету мишей вбивали зміщенням шийного хребця. Проводили патологоанатомічне дослідження тварин. Реєстрували патологічні зміни і підраховували число метастазних осередків меланоми в легенях.

Результати

1. Вплив пептиду на клітинний фагоцитоз у BALB/c мишей з трансплантованою саркомою S₁₈₀

Таблиця IV.1.

Вплив пептиду на індекс фагоцитозу у BALB/c мишей з трансплантованою саркомою S₁₈₀

Група	Доза	N	Індекс фагоцитозу
CMS001	50мкг/кг	20	6,24±0,33*^
CMS001	5мкг/кг	19	6,67±0,43*^
CMS034	5мкг/кг	19	6,20±0,44*^

Продовження таблиці IV.1.

Група	Доза	N	Індекс фагоцитозу
CMS034	0,5мкг/кг	20	6,35±1,02*
IL-2	3x10 ⁵ МО/кг	19	6,96±1,37*
IFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	17	5,45±0,71
Циклофосфамід	20мг/кг	19	5,92±2,47
Фізіологічний розчин	0,5 мл	19	5,38±0,85

* порівняння з фізіологічним розчином, P<0,05

^ порівняння з IFN-γ, P<0,05

Встановлено, що CMS001 в дозі 50мкг/кг/день і 5мкг/кг/день і CMS034 в дозі 5мкг/кг/день і 0,5мкг/кг/день здатні збільшувати індекс фагоцитозу при статистично значущій відмінності з групою,

яка одержує фізіологічний розчин.

2. Вплив пептиду на швидкість росту трансплантованої саркоми S₁₈₀ у BALB/c мишей

Таблиця IV.2.

Вплив пептиду на ріст трансплантованої пухлини S₁₈₀

Група	Доза	N	Вага пухлини (г)	Інгібування пухлини
CMS010	500мкг/кг	20	0,67±0,35*	48,4
CMS034	0,5мкг/кг	20	0,83±0,48*	35,9
CMS035	5мкг/кг	20	0,71±0,37*	44,6
IL-2	3x10 ⁵ МО/кг	20	0,69±0,37*	46,2
IFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	18	0,96±0,45	25,3
Циклофосфамід	20мг/кг	20	0,68±0,32*	47,3
Фізіологічний розчин	0,5мл	20	1,29±0,50	

*: порівняння з групою фізіологічного розчину, P<0,05

Встановлено, що CMS010 в дозі 500мкг/кг/день, CMS034 в дозі 0,5мкг/кг/день, CMS035 в дозі 5мкг/кг/день здатні знижувати ріст трансплантованої саркоми S₁₈₀ при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіо-

логічний розчин (P<0,05).

3. Вплив пептиду на виживання BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу (Метод 3)

Таблиця IV.3.

Вплив пептиду на індекс виживання BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу

Група	Доза	N	Дні виживання	Індекс виживання (%)
CMS008	5мкг/кг	20	50,7±20,9* [^]	67,8
CMS011	5мкг/кг	20	36,4±22,2* [^]	60,2
CMS024	50мкг/кг	20	36,3±12,7* [^] [§]	38,4
CMS024	5мкг/кг	19	40,6±14,6* [^] [§]	54,8
CMS024	0,5мкг/кг	19	46,4±14,8* [^] [§]	76,9
CMS032	0,5мкг/кг	20	42,8±12,2* [^] [§]	63,3
rhIL-2	3x10 ⁵ МО/кг	18	13,6±0,5	
rmIFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	20	27,8±7,5	6,1
Циклофосфамід	20мг/кг	20	24,7±10,2	
Фізіологічний розчин	0,5мл	19	26,2±6,8	

*: порівняння з фізіологічним розчином, P<0,05

^: порівняння з rmIFN-γ, P<0,05

§: порівняння з rhIL-2, P<0,05

§: порівняння з циклофосфамідом, P<0,05

Встановлено, що CMS008 в дозі 5мкг/кг/день, CMS011 в дозі 5мкг/кг/день, CMS024 в дозі

50мкг/кг/день, CMS024 в дозі 0,5мкг/кг/день і CMS032 в дозі 0,5мкг/кг/день здатні продовжувати

виживання BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$). Також спостерігали, що в групі CMS024 0,5мкг/кг/день більше 30% ($n=6$) мишей прожило довше 90 днів (два місяці після закінчення експерименту). Патологоанатомічне дослідження мишей не виявило ознак розвитку пухлини. Таким чином, CMS024 в дозі

0,5мкг/кг/день може перешкоджати росту трансплантованого H₂₂, перешкоджаючи його розвитку або індукуючи повне видужання від розвиненого раку.

4. Вплив пептиду на трансформацію Т-лімфоцитів у BALB/c мишей з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу (Метод 4.2)

Таблиця IV.4.

Вплив пептиду на трансформацію Т-лімфоцитів

Група	Доза	N	Індекс стимуляції
CMS010	500мкг/кг	20	1,45±0,21* [§]
CMS019	0,5мкг/кг	19	1,50±0,19* [§]
CMS024	0,5мкг/кг	19	1,46±0,19* [§]
CMS024	5мкг/кг	20	1,45±0,21* [§]
CMS034	0,5мкг/кг	20	1,37±0,10* [§]
CMS035	0,5мкг/кг	20	1,40±0,13* [§]
CMS035	5мкг/кг	20	1,46±0,16* [§]
rhIL-2	3x10 ⁵ МО/кг	19	1,46±0,21*
rmIFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	18	1,27±0,14
Циклофосфамід	20мг/кг	19	1,01±0,23*
Фізіологічний розчин	0,5 мл	20	1,25±0,07

*: порівняння з фізіологічним розчином, $P < 0,05$

§: порівняння з циклофосфамідом, $P < 0,05$

Встановлено, що CMS010 в дозі 500мкг/кг/день, CMS019 в дозі 0,5мкг/кг/день, CMS024 в дозі 0,5мкг/кг/день і 5мкг/кг/день і CMS035 в дозі 0,5мкг/кг/день і 5мкг/кг/день здатні збільшувати індекс стимуляції Т-лімфоциту при

статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$).

5. Вплив пептиду на активність NK клітин у мишей BALB/c з трансплантованим раком печінки H₂₂ асцитичного рідинного типу (Метод 4.3)

Таблиця IV.5.

Вплив пептиду на індекс цитотоксичної активності NK клітин

Група	Доза	N	Індекс NK активності
CMS003	500мкг/кг	17	37,9±14,5* [^] §
CMS014	0,5мкг/кг	17	40,7±19,7* [§]
CMS024	0,5мкг/кг	18	39,3±18,7* [§]
CMS024	5мкг/кг	20	34,9±12,1* [^] §
CMS024	50мкг/кг	20	43,6±13,9* [^] §
CMS032	5мкг/кг	20	52,6±12,5* [^] §
CMS032	50мкг/кг	19	41,0±18,7* [^] §
CMS034	50мкг/кг	20	57,3±17,9* [^] §
IL-2	3x10 ⁵ МО/кг	19	26,0±9,0
IFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	18	20,9±3,3
Циклофосфамід	20мг/кг	19	16,5±7,2*
Фізіологічний розчин	0,5мл	20	24,0±8,2

*: при порівнянні з фізіологічним розчином, $P < 0,05$

^: при порівнянні з IFN-γ, $P < 0,05$

§: при порівнянні з IL-2, $P < 0,05$

§: при порівнянні з циклофосфамідом, $P < 0,05$

Встановлено, що CMS003 в дозі 500мкг/кг/день, CMS014 в дозі 0,5мкг/кг/день, CMS024 в дозі 0,5мкг/кг/день, 5мкг/кг/день і 50мкг/кг/день і CMS034 в дозі 50мкг/кг/день здатні

збільшувати цитотоксичну активність NK клітин при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин ($P < 0,05$).

6. Вплив пептиду на виживання DBA/2 мишей

з трансплантованим L₁₂₁₀ лейкозом (метод 5)

Таблиця IV.6.

Вплив пептиду на індекс виживання тварин, що досліджуються

Група	Доза	N	Дні виживання	Індекс виживання(%)
CMS019	0,5мкг/кг	20	21,1±5,8*	26,8
CMS035	0,5мкг/кг	20	29,3±15,4*	76,1
IL-2	3x10 ⁵ МО/кг	20	32,0±13,7*	92,3
IFN-γ	3x10 ⁵ МО/кг	20	15,6±2,2	
Циклофосфамід	20мг/кг	20	24,0±5,3*	44,2
Фізіологічний розчин	0,5мл	21	16,6±5,6	

*: порівняння з групою фізіологічного розчину, P<0,05

Встановлено, що CMS019 в дозі 0,5мкг/кг/день і CMS035 в дозі 0,5мкг/кг/день здатні пролонгувати виживання DBA/2 мишей з трансплантованим L₁₂₁₀ лейкозом при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин

(P<0,05).

7. Вплив пептиду на гуморальний імунітет C₅₇BL/6 мишей з трансплантованою B₁₆ меланою (метод 6.1)

Таблиця IV.7.

Вплив пептиду на індекс гемолізу C₅₇BL/6 мишей з трансплантованою B₁₆ меланою

Група	Доза	N	Індекс гемолізу
CMS001	0,5мкг/кг	20	51,0±16,2* [§]
CMS001	5мкг/кг	20	41,3±17,7* [§]
CMS001	50мкг/кг	19	45,0±31,9* [§]
CMS001	500мкг/кг	20	36,0±10,2* [§]
CMS003	0,5мкг/кг	20	61,6±26,9* [§]
CMS003	5мкг/кг	20	37,2±15,9* [§]
CMS003	50мкг/кг	20	38,7±13,5* [§]
CMS003	500мкг/кг	20	35,9±13,0* [§]
CMS008	0,5мкг/кг	19	42,7±18,4* [§]
CMS008	5мкг/кг	20	38,9±12,0* [§]
CMS008	50мкг/кг	20	37,1±16,7* [§]
CMS008	500мкг/кг	20	50,1±17,8* [§]
CMS010	0,5мкг/кг	18	34,9±10,5* [§]
CMS010	5мкг/кг	20	51,0±14,6* [§]
CMS010	50мкг/кг	20	39,6±7,7* [§]
CMS010	500мкг/кг	20	50,1±16,7* [§]
CMS011	0,5мкг/кг	20	32,0±14,7*
CMS011	500мкг/кг	20	34,4±19,4*
CMS016	500мкг/кг	20	43,3±29,9*
CMS019	0,5мкг/кг	20	42,0±12,0* [§]
CMS019	5мкг/кг	20	35,4±15,1* [§]
CMS019	50мкг/кг	20	28,3±7,6*
CMS024	0,5мкг/кг	20	43,0±10,7* [§]
CMS024	5мкг/кг	20	42,2±11,8* [§]
CMS024	50мкг/кг	20	27,8±9,1*
CMS024	500мкг/кг	18	30,1±10,0*
CMS034	0,5мкг/кг	18	50,8±18,4* [§]
CMS034	5мкг/кг	19	43,0±11,7* [§]
CMS034	50мкг/кг	20	30,2±10,9*
CMS035	5мкг/кг	20	38,9±21,2* [§]
CMS035	50мкг/кг	20	44,7±22,7* [§]
CMS035	500мкг/кг	19	40,5±25,8*
rhIL-2	3x10 ⁵ МО/кг	19	49,3±24,7*

Продовження таблиці IV.7.

Група	Доза	N	Індекс гемолізу
rmIFN-γ	3x10 ⁹ МО/кг	19	60,5±17,4*
Циклофосфамід	20мг/кг	19	20,7±19,1
Фізіологічний розчин	0,5мл	20	19,0±9,1

*: порівняння з фізіологічним розчином, P<0,05

^: порівняння з mIFN-γ, P<0,05

&: порівняння з rhIL-2, P<0,05

\$: порівняння з циклофосфамідом, P<0,05

Встановлено, що CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS016, CMS019, CMS024, CMS034 і CMS035 здатні посилювати гуморальну реакцію (збільшення індексу гемолізу) у відповідь у C57BL/6 мишей з трансплантованою B₁₆ меланою в дозуванні, показаному в таблиці IV.7, при статистично значущій відмінності з групою, яка одержує фізіологічний розчин (P<0,05).

8. Вплив пептиду на виживання інокульованих клітин B₁₆ меланоми у C₅₇BL/6 мишей (метод 6.2)

Патологоанатомічне дослідження тварин після закінчення обробки речовиною, що тестується, не виявило яких-небудь ознак осередків метастазів B₁₆ в легені мишей, яких обробляли CMS008 в дозах 0,5мг/кг/день, 5мг/кг/день і 50мг/кг/день і CMS016 в дозах 5мг/кг/день і 500мг/кг/день.

Висновки

Відповідно до Вказівок за доклінічними дослідженнями нових лікарських засобів, випущених Відділенням введення лікарських засобів департаменту охорони здоров'я народної Республіки Китай в 1993 р., досліджений вплив пептиду на мишей з трансплантованими раковими клітинами. В результаті зроблений висновок, що:

1. CMS010, CMS034 і CMS035 у відповідному дозуванні можуть істотно інгібувати розвиток трансплантованої S₁₈₀ саркоми у мишей;

2. CMS001 і CMS034 у відповідному дозуванні можуть посилювати фагоцитарну імунну активність у мишей з трансплантованою S₁₈₀ саркомою;

3. CMS008, CMS011, CMS024 і CMS032 у відповідному дозуванні можуть пролонгувати виживання мишей, яким трансплантований рак печінки асцитичного рідинного типу H₂₂;

4. CMS010, CMS019, CMS024, CMS034 і CMS035 у відповідному дозуванні можуть посилювати трансформацію Т-лімфоцитів у мишей, яким трансплантований рак печінки асцитичного рідинного типу H₂₂;

5. CMS003, CMS014, CMS024, CMS032 і CMS034 у відповідному дозуванні можуть збільшувати цитотоксичну активність NK клітин у мишей, яким трансплантований рак печінки асцитичного рідинного типу H₂₂;

6. CMS019 і CMS035 у відповідному дозуванні можуть пролонгувати виживання мишей, яким трансплантований L₁₂₁₀ лейкоз;

7. CMS008 і CMS016 у відповідному дозуванні можуть інгібувати розвиток трансплантованої B₁₆ меланоми у мишей;

8. CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS016, CMS019, CMS024, CMS034 і

CMS035 у відповідному дозуванні можуть посилювати гуморальну імунну реакцію у відповідь у мишей, яким трансплантована B₁₆ меланома.

CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS014, CMS016, CMS019, CMS024, CMS032, CMS034, CMS035 можуть використовуватись як частина або самі по собі для лікування раку у людини. Наприклад, CMS001, CMS003, CMS008, CMS010, CMS011, CMS014, CMS016, CMS019, CMS024, CMS032, CMS034, CMS035 можна використати для посилення імунітету у пацієнтів, страждаючих раком, CMS008, CMS010, CMS016, CMS034 і CMS035 можуть використовуватись для запобігання росту ракових клітин у пацієнтів. CMS008, CMS011, CMS019, CMS024, CMS032 і CMS035 можна використати для пролонгування очікуваної тривалості життя хворих раком. Пептиди можна використати окремо, у вигляді комбінації двох або більше пептидів або у вигляді комбінації з іншими фармацевтичними препаратами або харчовими домішками як повний курс лікування раку.

Код CMS	SEQ ID No
CMS001	1
CMS003	27
CMS008	3
CMS010	4
CMS011	30
CMS014	7
CMS016	9
CMS019	11
CMS024	16
CMS032	22
CMS034	24
CMS035	25

Список літератури

1. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993,7:137-143
2. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993,7:128-129
3. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998,137-138
4. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 1991, 1221-1234
5. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993,7:140
6. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell

activity. China Immunology Journal. 1996,1(6): 356-358

7. Yaoqin Yang, Huchuan Yang, Huihong Tao, et al. The synergic effect of Tween-80 on the antitumor of hyperphenm'a - Experimental studies of mouse melanoma. Cancer Research on Prevention and Treatment. 1999,26(4): 8-12

8. Jian Fu, Jie Zheng, Weigang Fang, et al. Interleukin-12 gene transfection into murine B16 melanoma cells suppresses tumorigenicity and decreases metastatic potential. National Medical Journal of China. 1998,78(8): 627-629

9. Qian Wang. Modern medical experiment method. People's Health Publishing House. 1998, 482-483

10. Qichao Pan, Bin Xu. Cancer pharmacology and chemotherapy. Henan medical university Publishing House. 2000, 66-69

11. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998,131

V. Вплив на вагу тіла

Здорових щурів годували високопоживною дієтою протягом 5 тижнів з використанням одночасної обробки пептидом або без обробки (внутрішньом'язово 300мкг/кг/день). Як негативний контроль використали щурів зі звичайним харчуванням, яким вводили ін'єкції фізіологічного розчину. Через 5 тижнів обробки ін'єкції припиняли і підтримували такий же режим харчування ще протягом трьох тижнів. Дані ваги тіла збирали одночасно з тижневим інтервалом. Також спостерігали за поведінкою щурів. Було встановлено, що в процесі обробки пептидом у щурів, що одержували пептид CMS015, спостерігалось статистично значуще менше збільшення ваги тіла у порівнянні з контролем. Така тенденція зменшення ваги тіла поступово знижувалась після припинення обробки CMS015. Зроблений висновок, що CMS015 при відповідному рівні дозування може обернено контролювати розвиток ожиріння, індукований переїданням.

Матеріали

Щурів Sprague-Dawley (SD), вагою 145±10г поставляли з Центра експериментальних тварин Університету Гуаньчжоу Традиційної китайської медицини (Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine), КНР (сертифікат №2000A019). Пептиди були синтезовані звичайним чином (на основі L-амінокислот) American Peptide company, Inc., США, і розводили до концентрації 10мкг/мл у звичайному фізіологічному розчині. Високопоживне і звичайне харчування готували відповідно до вказівок для доклінічного дослідження лікарських засобів проти ожиріння, виданих SDA (Державне управління лікарських засобів), КНР^[1].

Методи

Здорових щурів статистично розподіляли на експериментальну, позитивну контрольну і негативну контрольну групи з розрахунку 10 щурів на групу, половина самці і половина самиці. Експериментальну групу щурів годували високопоживною дієтою протягом 5 тижнів з одночасним введенням пептиду в дозі 300мкг/кг/день один раз на день шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Позитивна контрольна група одержувала ту ж саму високопоживну дієту, але «плацебо» ін'єкцію фізіологічного розчину, тоді як група негативного контролю, використаної для доказу успішного встановлення моделі ожиріння, одержувала звичайне харчування з «плацебо» ін'єкцією фізіологічного розчину. Через 5 тижнів обробки ін'єкції припиняли і підтримували ту ж модель харчування ще протягом 3 тижнів. Щурів зважували одночасно з тижневим інтервалом. Також спостерігали за поведінкою щурів.

Дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення. Парний t критерій або однофакторний ANOVA використали для порівняння між групами і всередині груп. Гранична статистична значущість складала $P \leq 0,05$.

Результати

1. Вплив пептиду на вагу тіла щура SD

Таблиця V.1.

Вплив пептиду на вагу тіла щура SD

	Група позитивного контролю (г)		CMS015 Група обробки (г)	
	Самці n=5	Самиці n=5	Самці n=5	Самиці n=5
До обробки	145,6±13,6	133,6±4,6	145,6±8,5	129,2±3,3
Тиждень 1	194,4±14,5	164,4±8,7	183,8±10,6	157,8±8,3
Тиждень 2	239,6±13,4	188,0±6,4	220,6±12,2*	176,0±11,2*
Тиждень 3	265,0±11,8	208,8±8,2	239,0±16,0*	196,0±10,5*
Тиждень 4	287,4±17,7	227,2±8,2	258,2±18,1*	212,0±13,5*
Тиждень 5	299,4±21,2	236,6±10,9	268,8±17,7*	221,4±13,2*
Тиждень 6	333,41±7,1	249,4±16,3	299,4±21,2*	235,6±16,3
Тиждень 7	349,21±28,9	261,2±13,4	310,4±25,9*	242,2±18,8*
Тиждень 8	374,4±37,2	255,6±11,5	337,4±30,6	252,8±22,5

* при порівнянні з групою позитивного контролю: $p < 0,05$

Було встановлено, що в дозі 300мкг/кг/день CMS015 здатний обмежувати збільшення ваги у ожирілих щурів, викликане переїданням, вияв-

ляючи статистично значущу відмінність при порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Різниця між групою обробки і контрольною групою збільшувалась

лась при збільшенні тривалості обробки. При припиненні обробки пептидом CMS015 в групі обробки різниці між групою обробки і контрольною групою поступово знижувалась і ставала статистично незначущою через три тижні, показуючи, що вплив пептиду вагою тіла щурів SD є оборотним.

Протягом всього експерименту спостерігалось, що апетит і активність всіх груп щурів залишались нормальними.

Обговорення

Зроблений висновок, що CMS015 при відповідному рівні дозування може обмежувати розвиток ожиріння, індукованого переїданням. Пептид можна використати на людині для боротьби з ожирінням. Пептиди можна використати самі по собі, у вигляді комбінації двох або декількох пептидів або у вигляді комбінації з іншими фармацевтичними препаратами або харчовими домішками як повний курс лікування ожиріння.

В даному дослідженні тестували введення за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції, але це не виключає можливої ефективності пептиду при його введенні іншими альтернативними шляхами. Пептиди можна вводити шляхом внутрішньовенної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньоочеревинної ін'єкції, підшкірної ін'єкції і підшкірної імплантації, з використанням або без використання пристрою, що полегшує доставку лікарського засобу, такого як ліпосоми, захист для уповільненого вивільнення і т.д. Пептид також можна вводити у будь-якій формі для перорального введення, такий як таблетка, капсула, суспензія, розчин і т.д. у звичайній відповідній формі без модифікації або у вигляді форми з уповільненим вивільненням, з використанням або без використання шлунково-кишкового захисту. Крім того, пептид можна використати в будь-якій формі для місцевого застосування, такий як мазь, крем, гель і т.д., з використанням або без використання пристрою, що полегшує черезшкірне проникнення, або у вигляді інгаляції порошку в розчиненому або ліпосомно-захищеному вигляді. Пептид також може бути конвертований в його генетичну послідовність і клонований в систему експресії, або сам по собі або в поєднанні з іншими пептидними послідовностями, для утворення кінцевої пептидної молекули для використання активності пептидів, як описано в даному винаході, з очищенням або без очищення кінцевого пептиду.

Таблиця V.2.

Ефективність пептидів при ожирінні

Код CMS	SEQ ID No
CMS015	8

Література

1. SDA PR China, The guideline for pre-clinical research of new drugs, 1993.

Потрібно розуміти, що можливо додавати додаткові амінокислоти до амінного або карбоксильного кінця описаних вище пептидів як інший метод практичного здійснення винаходу. Наприклад, одна або дві амінокислоти можуть бути додані до

описаного пептиду без впливу на його біологічну дію. Також можна додати три або чотири амінокислоти і все ще зберегти функцію пептидів. Всі вони згадуються як варіанти одного і того ж пептиду. Альтернативно, одна або дві амінокислоти можуть бути видалені з пептиду без впливу на його біологічну активність. Крім того, можливо видалити три або чотири амінокислоти, без впливу на біологічну функцію пептидів. Вони згадуються як фрагменти даного пептиду. Крім того, для практичного здійснення іншого аспекту даного винаходу можна використати похідні пептиду, наприклад, що одержуються при консервативному заміщенні однієї амінокислоти на іншу амінокислоту того ж самого функціонального класу. Наприклад, в пептидах, що мають неполярні або гідрофобні бічні ланцюги, можливе заміщення однієї бічної групи на іншу без зниження біологічної активності. Як додатковий приклад лінкер/спейсер може бути введений в пептид з утворенням варіантів, але варіантів, які все ще зберігають свій активний фрагмент як первинний пептид, використаний в даному дослідженні. Вони також являють собою варіанти пептидів, що розглядаються. Аналог пептиду, як використано в даному описі, включає пептиди, що мають молекули амінокислот, які імітують структуру природної амінокислоти, наприклад, аналог з іншою структурою скелета або D-амінокислотним заміщенням. Як додатковий приклад, хоча амінокислоти, використані для синтезу пептидів, являють собою L-оптичні ізомерні форми, пептиди з однією або більшою амінокислотами в послідовності, заміщені на D-форму, можуть володіти подібною біологічною активністю. Мається на увазі, що термін «функціональне похідне», як він використаний у формулі винаходу, включає фрагменти, варіанти, аналоги або хімічні похідні пептиду.

Як використано в даному описі термін «гібридний пептид» використовується для позначення пептидів, які містять додаткові пептиди, вбудовані в первинні біологічно активні пептиди, з SEQ ID No: 1-30 або їх функціональні похідні, але які всі ще зберігають по суті аналогічну активність. Додаткові пептиди включають лідерні пептиди, які містять, наприклад, амінокислотну послідовність, яка розпізнається однією або більшою прокаріотичними або еукаріотичними клітинами як сигнал для секреції гібридного білка в оточуюче середовище або в клітину. Секреція може являти собою безпосередньо секрецію або непрямую секрецію за допомогою секреторних везикулів.

«По суті чистий пептид» відноситься до пептидів, які володіють принаймні 10% ваг./ваг. чистотою, більш переважно 20%, ще більш переважно 40%; і набагато більш переважно 60% і ще більш переважно більше ніж 90% чистотою. У найбільш переважному варіанті здійснення чистота перевищує 99%. По суті чистий пептид можна використати для одержання фармацевтичних і харчових композицій, які можуть являти собою складні суміші, як описано далі.

Застосування вищезгаданих пептидів у фармацевтичних композиціях можна використати для можливого лікування імунологічних порушень або захворювань, що володіють вторинною дією на

імунітет, таких як рак або інфекції або будь-який з відмічених вище хворобливих станів. Композиції можуть містити один з ідентифікованих пептидів, змішаних з іншими активними або неактивними складовими, включаючи інші пептиди. Наприклад, два або декілька (наприклад, 3-5) з перерахованих пептидів можуть бути додані в одну і ту ж композицію або без інших інгредієнтів. Альтернативно, один з перерахованих пептидів можна використати для одержання композиції разом з пептидами, не перерахованими в даному винаході. Їх можна вводити внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, підшкірно або інтрадермально. Спосіб введення також може являти собою внутрішньоартеріальну ін'єкцію, яка приводить безпосередньо до хворого органу. Іншими способами введення є черезшкірне введення, інгаляція у вигляді порошку або спрею та інші види доставки, відомі в даній області. Композиція також може являти собою препарат, що приймається перорально, і може містити носії, які використовуються для запобігання розщепленню пептиду в шлунку після перорального прийому або будь-які інші носії, відомі в даній області (для черезшкірного введення такі як ліпосоми).

Фармацевтична композиція може включати будь-який з відомих фармацевтичних носіїв. Приклади відповідних носіїв включають будь-який стандартний фармацевтично прийнятний носій, відомий фахівцям в даній області. Вони включають, але не обмежуються цим, фізіологічний розчин, воду, емульсії, включаючи масляні і водні суміші або емульсії тригліцеридів, та інші типи агентів, наповнювачів, покритих оболонкою таблеток і капсул. Відповідний носій може бути вибраний на основі способу введення фармацевтичної композиції.

Пептиди можна вводити за допомогою внутрішньовенної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньоочеревинної ін'єкції, підшкірної ін'єкції і підшкірного імплантування. Пептид також можна вводити у будь-якій формі для перорального введення, такий як таблетка, капсула, суспензія, розчин і т.д. у звичайній відповідній формі без модифікації або у вигляді форми з уповільненням вивільненням, з використанням або без використання шлунково-кишкового захисту. Крім того, пептид можна використати у будь-якій формі для місцевого застосування, такий як мазь, крем, гель і т.д., з використанням або без використання пристрою, що полегшує черезшкірне проникнення. Пептид також може бути конвертований в його генетичну послідовність і клонований в систему експресії, або сам по собі або в поєднанні з іншими пептидними послідовностями, для утворення кінцевої пептидної молекули для використання активності пептидів, як описано в даному винаході.

Доза кожного пептиду може становити 1нг - 10г на кг ваги тіла. Переважна доза становить 10нг - 10мг на кг і більш переважно 1мкг - 1мг на кг для ін'єкційного способу введення. Однак ефективна доза може бути такою низькою як 1нг на кг ваги тіла, оскільки один або більше пептидів можуть діяти за допомогою рецепторів, які індукують каскад нормальної фізіологічної реакції у відповідь.

Альтернативно, один або більше пептидів можуть бути тільки ініціаторами для цілого каскаду реакцій. Для перорального прийому кількість може становити 1нг - 10г в день на кг ваги тіла, більш переважно 0,1мкг - 1г в день на кг ваги тіла і навіть більш переважно 1мкг - 10мг на день.

VI. Генотерапія і спосіб лікування

Генотерапію на основі відкритих пептидних послідовностей здійснюють шляхом створення послідовності нуклеїнових кислот, яка кодує один з даних пептидів. Нуклеїнова кислота може бути синтезована хімічно або функціонально лігвана з промотором і клонована у вектор експресії. Вектор експресії потім вводять в організм людини у вигляді форми генотерапії для експресії в клітині людини. Термін «генетичні вектори», як він використаний в даному описі, включає такі вектори експресії. Вектори, які можна використати для генотерапії, включають адено-асоційований вірус [Mizuno M., et al., 1998, Jpn J Cancer Res., 89, 76-80], вектори LNSX [Miller A.D. et al., (1993), Methods Enzymol, 217, 581-599] і лентивірус [Goldman M.J. et al., (1997) Hum Gene Ther., 8, 2261-2268].

Інші носії для доставки пептиду включають вектори експресії, що кодує бажаний пептид, які можуть бути перенесені в організм, які можуть реплікуватись в організмі-хазяїні, якому бажано ввести пептид, без значного шкідливого впливу на здоров'я організму-хазяїна. Наприклад, вектори експресії можуть бути перенесені в організм, який не є патогенним для організму-хазяїна, якому бажано ввести пептид. У деяких варіантах здійснення вектор експресії продукує цільовий пептид в організмі бактерії або гриба, які не надають значного шкідливого впливу на здоров'я організму-хазяїна, якому вводиться пептид. Наприклад, вектор експресії, що кодує бажаний пептид, може являти собою вектор експресії, який продукує бажаний пептид в організмі, такому як молочнокисла бактерія, *E.coli* або дріжджі. В одному варіанті здійснення вектор експресії продукує бажаний пептид в мікробі, що звичайно виявляється в шлунково-кишковому тракті ссавця або в мікробі, який толерантний шлунково-кишковому тракту ссавця. Деякі з різновидів мікробів, в яких може експресуватись бажаний пептид, включають, але не обмежуються цим, вид *Lactobacillus*, такі як *L.acidophilus*, *L.amylovorus*, *L.casei*, *L.crispatus*, *L.gallinarum*, *L.gasseri*, *L.johnsonii*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus* або інші; види *Bifidobacterium*, такі як *B.adolescentis*, *B.animalus*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.lactis*, *B.longum* або інші; *Enterococcus faecalis* або *Ent.facium*; *Sporolactobacillus inulinus*; *Bacillus subtilis* або *Bacillus cereus*; *Escherichia coli*; *Propionibacterium freudenreichii*; або *Saccharomyces cerevisiae* або *Saccharomyces boulardii*.

Послідовності нуклеїнових кислот, які кодує пептиди за даним винаходом, синтезовані хімічно або продуковані іншими способами, включаючи, але не обмежуючись цим, оборотну транскрипцію мРНК для продукування молекул ДНК, включені у вектори експресії для генного перенесення в цільові організми способами генної інженерії, зна-

йомими фахівцям в даній області. Вектори експресії можуть бути ДНК векторами або РНК векторами. Наприклад, вектори експресії можуть бути основані на плазмідних або вірусних генетичних елементах. Вектори експресії можуть являти собою вектори, які реплікуються позахромосомно, або вектори, інтегровані в хромосоми.

Вектори експресії включають промотор, функціонально пов'язаний з нуклеїновою кислотою, що кодує пептид за даним винаходом. Промотор може являти собою регульований промотор, такий як індукцйбельний промотор або конститутивний промотор. У деяких варіантах здійснення промотор може бути вибраний для забезпечення бажаного рівня експресії пептиду. Додатково, за бажанням, вектори експресії можуть включати інші послідовності для стимулювання продукування, презентації і/або секреції пептидів. У деяких варіантах здійснення нуклеїнова кислота, що кодує пептид за даним винаходом, функціонально пов'язана з послідовністю нуклеїнових кислот, яка регулює секрецію пептиду. Наприклад, нуклеїнова кислота, що кодує пептид за даним винаходом, може бути функціонально пов'язана з нуклеїновою кислотою, що кодує сигнальний пептид.

У деяких варіантах здійснення вектори експресії, які сконструйовані для кодування пептидів за даним винаходом, можуть являти собою вектори експресії, які адаптовані для експресії пептиду за даним винаходом у видах бактерій, які створюють нормальну флору в шлунково-кишковому тракті ссавців, таких як види *Lactovacillus* і *Bacillus subtilis*. Приклади таких векторів експресії можна знайти в патентах США №6100388, Casas, і №5728571, Bellini, відповідно. Дані документи спеціально включені в даний опис як посилання у всій своїй повноті. Потрібно розуміти, що можна використати будь-який вектор експресії, який полегшує експресію пептиду за даним винаходом в організмі, який не впливає негативним чином на здоров'я організму-хазяїна, якому потрібно вводити пептид.

У деяких варіантах здійснення вектори експресії, які сконструйовані для кодування пептидів за даним винаходом, можуть являти собою вектори експресії, які адаптовані для експресії пептиду за даним винаходом у видах дріжджів, які добре переносяться шлунково-кишковим трактом ссавців, таких як *Saccharomyces cerevisiae*; або, переважно *Saccharomyces boulardii*, які можуть заселяти шлунково-кишковий тракт людини або використовуються для лікування деяких форм діареї. Можна використати дріжджові вектори експресії, які конститутивно експресують гетерологічні білки і пептиди, і є високо стабільними, тому добре передаються потомству клітини під час мітозу і мейозу і можуть включати кодуєчу послідовність сигнального пептиду або пептидів, які регулюють високі рівні секреції рекомбінантного білка. Приклад такого дріжджового вектора наведений в патенті США №6391585, Jang et al., який включений в даний опис як посилання у всій своїй повноті.

Вектори експресії, що кодують пептиди за даним винаходом, можуть бути введені в організм, який призначений для експресії пептидів, методами, відомими в даній області. Такі методи вклю-

чають традиційні методи трансформації бактерій, дріжджів або інших мікроорганізмів за допомогою використання хімічно компетентних бактеріальних клітин, електропорації або літій-ацетатної трансформації (для дріжджів), також, наприклад, з використанням останніх досягнень у трансформації бактеріальних видів, стійких до таких методик. У деяких варіантах здійснення вектори експресії вводять в молочнокислі бактерії, відомі як стійкі до трансформації, за допомогою способу, описаного Leer et al. (WO 95/35389), який включений в даний опис як посилання у всій своїй повноті. Послідовності, що вводяться, можуть бути внесені в мікробні хромосоми ДНК, або вони можуть залишатися позахромосомними ДНК елементами.

Такий генетично сконструйований мікроб, що містить вектор експресії, потім може бути інокульований в харчовий тракт, піхву, трахею і т.д. для здійснення пролонгованої імунотерапії. У деяких варіантах здійснення організми, які експресують пептиди за даним винаходом, проковтують в неактивній формі або, переважно, в живій формі. У травному тракті дані мікроорганізми продукують вказані пептиди, вивільняючи їх в просвіт шляхом секреції або лізисом мікроорганізму або яким-небудь іншим чином, надаючи пептиди хазяїну, при цьому мається на увазі, що продуковані при цьому пептиди надають дію на організм-хазяїн. В інших варіантах здійснення пептиди надаються хазяїну на слизовій мембрані носових проходів, піхви або тонкого кишечника.

Інший спосіб лікування полягає у використанні ліпосом як засобів доставки конкретної нуклеїнової кислоти в клітини тіла людини. Нуклеїнова кислота (така як вектор експресії, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує пептиди з послідовностями SEQ ID No: 1-30) доставляється в оточуюче середовище, яке підтримує клітинне поглинання і хромосомне злиття, як описано Gao X. і Huang L. (1995), *Gene Ther.*, 2, 710-722, і патенті США 6207456. Альтернативно, сам пептид може бути інкапсульований в ліпосому і безпосередньо доставлений з використанням способу, описаного в патенті США 6245427. Всі вказані вище наукові публікації і патенти включені в даний опис як посилання.

Послідовності нуклеїнових кислот, придатні для вищезгаданої гемотерапії і способу лікування включають послідовності, які кодують дані пептиди і їх функціональні похідні. Будь-яка з численних послідовностей нуклеїнових кислот може бути використана для кодування даних пептидів і з похідних на основі виродженості генетичного коду.

Наступні посилання включені в даний опис у всій своїй повноті.

1. Principles of Pre-clinical Research of New Drugs, People's Republic of China. 1993, 7:134-135

2. Shuyun Xu, Rulian Bian, Xiu Chen. Methodology of pharmacological experiment. People's Health Publishing House. 1991, 1221-1234

3. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7:140

4. Jinsheng He, Ruizhu Li, Tingyi Zong. The study on MTT reduction method of testing NK cell

activity. China Immunology Journal. 1996, 1(6): 356-358

5. Qian Wang. Modern medical experiment method. People's Health Publishing House. 1998, 482-483

6. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7: 141

7. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7: 132-133

8. Principle of new drug research in pre-clinic issued by Ministry of Health, People's Republic of China. 1993, 7: 128-129

9. Yuanpei Zhang, Huaide Su. Pharmacological experiment (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 137-138

10. Jiatai Li, Clinical pharmacology (second edition). People's Health Publishing House. 1998, 1338-1339.

Приклад 1

Доставка пептидів за допомогою генетично сконструйованих видів бактерій *Lactobacillus*

Далі представлений один з ілюстративних способів доставки пептидів за винаходом хазяїну, як описано вище.

Послідовність ДНК, що кодує один з пептидів, перерахованих вище в таблиці А, синтезована хімічними способами, і дана ДНК послідовність вбудована у вектор експресії з використанням стандартних методів генної інженерії, відомих фахівцям в даній області. Вибраний вектор експресії містить конститутивний промотор, функціональний в *Lactobacillus*, сайт множинного клонування для введення ДНК послідовностей в специфічне 5'-3' положення, а також селективний маркерний ген, який надає стійкість до антибіотика (для полегшення процедури клонування) і може включати інші послідовності, щоб сприяти продукуванню і/або секреції пептидів, таких як сигнальні пептидні послідовності. Приклад такого вектора наведений в патенті США 5592908, Рама, який включений в даний опис як посилання у всій своїй повноті. Стило, в даному патенті обговорюються декілька відомих промоторів, які діють у видах *Lactobacillus*, а також спосіб виявлення нових промоторів у вказаній бактерії, будь-який з яких може бути функціонально пов'язаний з нуклеїновою кислотою, що кодує пептид за даним винаходом для експресії пептиду *Lactobacillus*. Нуклеїнову кислоту, що кодує сигнальний пептид, такий як пептиди, що містять 16-35 найбільш гідрофобних амінокислот, які є активними в *Lactobacillus lactis*, описані у вказаному вище патенті США 5529908, вміщують між промотором і нуклеїновою кислотою, що кодує пептид за даним винаходом таким чином, що нуклеїнова кислота, яка кодує сигнальний пептид, знаходиться в рамці разом з нуклеїновою кислотою, що кодує пептид за даним винаходом.

У доповнення до кодуєчої послідовності пептиду синтезована послідовність ДНК може включати послідовності для полегшення лігування і клонування вказаної ДНК у вектор експресії. Наприклад, сайти розпізнавання рестриктаз, які відповідають сайтам, що виявляються в сайті мно-

жинного клонування вектора, може бути вбудований в синтезовану ДНК на 5' і 3' кінцях послідовності таким чином, що послідовність може бути клонована у правильній орієнтації у вектор. Як вектор, так і синтезована ДНК розщеплюються конкретними ферментами рестрикції, а потім очищаються. Після реакції лігування вектора і синтезованої ДНК проводять трансформувannya у відповідний штам *E.Coli*. Трансформовану бактерію вміщують в середовище, що містить антибіотик, до якого вектора надана стійкість. Колонію трансформованих бактерій відбирають для росту культур і процедур одержання плазмід; підтверджують присутність синтезованої ДНК у правильній орієнтації.

Такий вектор експресії потім трансформують в бактеріальну клітину-хазяїна видів *Lactobacillus*, таких як *L.acidophilus*. Трансформовані клітини відбирають на основі селективного маркера, що виявляється в послідовності вектора, і секреція пептиду може бути підтверджена проведенням вестерн-блотингу, проведенням гелевого електрофорезу пептидів, присутніх в середовищі для росту, або іншими стандартними способами. Відбирають трансформовану колонію бактерій і використовують для одержання у великому масштабі культури бактерій, одержаних методами генної інженерії. Вирощують культуру генетично сконструйованих бактерій, які експресують бажаний пептид, і принаймні частину її вводять в травний тракт, піхву, трахею або інші області організму-хазяїна, де бактерії здатні реплікуватись. За бажанням, бактеріальні культури можуть бути оброблені різними способами для одержання домішок до споживання в кишечнику хазяїна. Такі обробки включають ліофілізацію або інші способи збереження бактерій, в доповнення до комбінування бактерій з агентами-нодіями, такими як розчини, розчинники, диспергуючі середовища, агенти, які затримують вивільнення, емульсії і тому подібні. Застосування таких агентів для одержання домішок добре відоме в даній області. Наприклад, бактерії можна використати для одержання молочних продуктів або інших продуктів харчування, які містять культури, для споживання людиною, так що організм, що експресує пептид, утворює колонії в травному тракті організму-хазяїна. Число різних способів введення специфічних штамів молочнокислих бактерій в продукти харчування, такі як йогурт, кимчі, сир і масло, описані в патенті США 6036952, Он, який включений в даний опис як посилання у всій своїй повноті. При споживанні бактерій через один з множини шляхів сконструйовані організми можуть заселяти в травний тракт і дати можливість надавати і/або поглинати пептиди за даним винаходом через слизовий шар травного тракту.

Приклад 2

Доставка пептидів за допомогою генетично сконструйованих форм *Bacillus subtilis*

Далі представлений інший ілюстративний спосіб доставки пептидів за винаходом хазяїну, як описано вище. Послідовність ДНК, що кодує один з пептидів, перерахованих вище в таблиці А, синтезована хімічними способами, і дана ДНК послідовність вставлена у вектор експресії з викорис-

танням стандартних методів генної інженерії; всі методи відомі фахівцям в даній області. Вибраний вектор експресії включає човниковий вектор, такий як pTZ18R (Pharmacia, Piscataway, NJ), здатний розмножуватись як в *E.coli*, так і в *B.Subtilis* і який містить ген стійкості до антибіотиків для відбору колоній трансформованих бактерій. Такий вектор може містити конститутивний промотор, активний в *B.Subtilis*, такий як промотор, одержаний з *Sac B* гена *B. Subtilis*, а також нуклеотидну послідовність, що кодує сигнальний або лідерний пептид, активний в *B.Subtilis*, який регулює ефективний експорт експресованих гетерологічних білків з бактеріальної клітини. Приклад такого вектора описаний в патенті США 6268169, Fahnestock, опис якого включений як посилання у всій своїй повноті. Стило, як детально описано вище, ДНК, що кодує пептид за даним винаходом, буде синтезована з допомогою ферментативних сайтів рестрикції і/або інших послідовностей для полегшення клонування ДНК за допомогою методів, знайомих фахівцям в даній області. Після трансформації в *E.Coli*, вирощування культури на пластинці, відбору і розмноження плазмід для створення джерела плазмід, плазмиду трансформують в *B.Subtilis* і відбирають трансформанти на основі стійкості до антибіотика в середовищі для вирощування культури.

Продуктування пептиду і секрецію з генетично сконструйованих *B.Subtilis* підтверджують з використанням способів, добре відомих фахівцям в даній області, таких як мічення пептидів ізотопною міткою для авторадіографічного виявлення після SDS-PAGE аналізу або вестерн-блотингу.

Вирощують культуру генетично сконструйованих бактерій і принаймні частину її вводять в травний тракт, піхву, трахею або інші області організму-хазяїна, де бактерії здатні відтворюватись.

Приклад 3

Доставка пептидів за допомогою генетично сконструйованих видів дріжджів *Saccharomyces*

Далі представлений інший ілюстративний спосіб доставки пептидів за винаходом хазяїну, як описано вище. Послідовність ДНК, що кодує один з пептидів, перерахованих вище в таблиці А, синтезована хімічними способами, і дана ДНК послідовність вставлена у вектор експресії з використанням методів генної інженерії; всі методи відомі фахівцям в даній області. Вибраний вектор експресії включає дріжджовий білковий вектор експресії, що стабільно підтримується, який включає конститутивний дріжджовий промотор, такий як *rADH1*, сайти для реплікації вектора як в дріжджах, так і в *E.coli*., ген, що надає фототрофію ауксотрофним дріжджовим мутантам для вибраних цілей, сайт множинного клонування (MCS) і, за

бажанням, послідовності, які кодують сигнальний пептид. Вектори, такі, як вказаний, є комерційно доступними і добре відомі в даній області або легко можуть бути сконструйовані з використанням стандартних методів. Після вбудовування синтезованої ДНК в дріжджовий вектор, трансформації в *E.Coli*, вирощування трансформованих *E.Coli* на селективному середовищі, відбору трансформованої бактеріальної колонії і одержання плазмідної ДНК з вирощеної культури бактерій з вказаної колонії, вектор трансформують в *Saccharomyces cerevisiae* за допомогою добре відомих способів, таких як літій-ацетатне трансформування або електропорація. Штам *Saccharomyces cerevisiae*, вибраний для трансформації, являє собою мутантний ауксотрофний штам, який вимагає генів на плазміді для росту на мінімальному середовищі на пластинках. Трансформовані дріжджові колонії виділяють, вирощуючи дріжджі на середовищі для росту без гена, вбудованого у вектор. Тільки такі дріжджі, які одержали вектор і його селективний ген і експресують такий генний продукт, будуть здатні зростати в колонії на мінімальному середовищі. Підтвердження секреції пептиду може бути одержане при проведенні вестерн-блотингу, проведенні гелі-електрофорезу пептидів, присутньому в середовищі росту, або іншими стандартними способами.

Відбирають трансформовану колонію дріжджів і використовують для великомасштабного одержання культур. Вирощують культуру генетично сконструйованих дріжджів і принаймні частину її вводять в травний тракт, піхву, трахею або інші області організму-хазяїна, де бактерії здатні відтворюватись. За бажанням, дріжджові культури можуть бути оброблені різними способами для одержання домішок для споживання в кишечнику хазяїна. Такі обробки включають ліофілізацію або інші способи збереження дріжджів, в доповнення до комбінування бактерій з агентами-носіями, такими як розчини, розчинники, диспергуючі середовища, агенти, які затримують вивільнення, емульсії і тому подібні. Застосування таких агентів для одержання домішок добре відоме в даній області. В іншому варіанті здійснення трансформовані дріжджі використовують для створення харчових продуктів, таких як ферментовані молочні продукти, наприклад, йогурт і кефір, з використанням технологій, добре відомих фахівцям в даній області. Як і у випадку живих молочнокислих бактеріальних культур, в таких продуктах харчування трансформовані дріжджі утворюють колонії в травному тракті принаймні тимчасово і служать для надання пептидів хазяїну через просвіт травного тракту.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Wong, Wai Ming
Lin, Gang

<120> Біологічно активні пептиди

<130>

<140> невідомий

<141> 2002-06-20

<150> 09/904,492

<151> 2001-07-13

<160> 30

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 1

Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe
1				5					10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 2

Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe
1				5				

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 3

Lys	Ala	Val	Gly	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu
1				5					10			

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 4

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn
 1 5 10 15
 Pro Lys

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 5
 Leu Gly Met Glu Ala Cys Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 6
 Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 7
 Ala Ala His His Pro Asp Asp Phe Asn Pro Ser Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 8
 Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg His Gln Gly Val Met
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 9
 Ile Gly Met Glu Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 10

Val Gly Met Gly Glu Lys Asp Ser Tyr
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 11

Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 12

Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 13

Met Ala Thr Ala Ala Ser Ser Ser Ser Leu
1 5 10

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 14

Tyr Ser Phe
1

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 15

Ala Ala Phe
1

<210> 16

<211> 3
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 16
Tyr Ser Leu
1

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 17
Thr Thr Tyr Asn Ser Ile Met
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 18
Phe Glu Glu Asn Met
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 19
Phe Glu Pro Ser Phe
1 5

<210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 20
Phe Asn Glu Glu
1

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 21
Phe Glu Glu Met
1

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 22
Phe Glu Glu Glu
1

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 23
Phe Glu Ser Phe
1

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 24
Pro Glu Asn Phe
1

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 25
Phe Val Asn Asp
1

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 26
Phe Gln Pro Ser Phe
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 27
Phe Asn Phe Val Pro Pro
1 5

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 28
 Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 29
 Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<400> 30
 Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu
 1 5 10