

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 108778 (13) C2**
(51) МПК (2015.01)**C07K 14/475 (2006.01)****C07K 14/705 (2006.01)****A61K 38/16 (2006.01)****A61P 35/00****ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2013 09548	(72) Винахідник(и): Пєчи́колан Єжи Щепан (PL), Павлак Себастьян Домінік (PL), Жерек Бартломей Мацей (PL), Рузга Пьотр Каміл (PL)
(22) Дата подання заявки: 05.01.2012	(73) Власник(и): АДАМЕД СП. З О.О., Pieńków 149, PL-05-152 Czosnów k/Warszawy, Poland (PL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.06.2015	(74) Представник: Маслова Тетяна Михайлівна, реєстр. №61
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: PL393578	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2004/035794 A1, 29.04.2004 WO 2010/005519 A1, 14.01.2010 CN 1546528 A, 17.11.2004 CN 1609124 A, 27.04.2005 REN N ET AL: "Expression of Tumstatin183- 230-TRAIL fusion protein and identification of its biological functions", ACADEMIC JOURNAL OF SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY, vol. 29, no. 5, may 2008 (20008-05), pages 474-478 WO 2009/140469 A2, 19.11.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 05.01.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: PL	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.10.2013, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2015, Бюл.№ 11	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/EP2012/050145, 05.01.2012	

(54) ПРОТИРАКОВИЙ ЗЛИТИЙ ПРОТЕЇН**(57) Реферат:**

Винахід стосується злитого протеїну, що містить: домен (а), який включає функціональний фрагмент послідовності розчинного протеїну hTRAIL, причому даний фрагмент починається амінокислотою в позиції не нижче, ніж hTRAIL 95, або послідовність, що має принаймні 70 % ідентичність до функціонального фрагмента, і домен (b), що являє собою послідовність антиангіогенного ефекторного пептиду, який є інгібітором рецептора фактора росту і вибраний з групи фрагментів фактора росту, що містять фрагмент VEGF SEQ ID NO: 17, фрагмент PDGF SEQ ID NO: 22 і фрагмент EGF SEQ ID NO: 23; при цьому послідовність домену (b) приєднана в точці С - кінця або точці N - кінця домену (а). Даний злитий протеїн може бути застосованим для лікування онкологічних захворювань.

UA 108778 C2

Винахід відноситься до області терапевтичних злитих протеїнів, зокрема, рекомбінантних злитих протеїнів. Більш конкретно, винахід відноситься до злитих протеїнів, що містять фрагмент послідовності розчинного людського протеїну TRAIL в поєднанні з послідовністю антиангіогенного пептиду, до фармацевтичних композицій, що їх містять, їх застосування в терапії, зокрема, в якості протиракових речовин, і до полінуклеотидних послідовностей, що кодують злиті протеїни, векторів експресії, які включають полінуклеотидні послідовності, і до клітин-хазяїнів, що містять зазначені вектори експресії.

Протеїн TRAIL, що належить до сімейства цитокінів (ліганд, що викликає апоптоз, який має відношення до фактору некрозу пухлини), також відомий як Apo2L (Apo2-ліганд), є потужним активатором апоптозу в пухлинних клітинах і в клітинах, інфікованих вірусами. TRAIL є лігандом, що виникає в організмі природним шляхом. Протеїн TRAIL, його амінокислотна послідовність, яка кодує послідовності ДНК, та системи експресії протеїну, були вперше розкриті в EP0835305A1.

Протеїн TRAIL проявляє свою протиракову активність, зв'язуючись з проапоптотичними поверхневими TRAIL рецепторами 1 і 2 (TRAIL-R1/R2) і забезпечуючи наступну активацію цих рецепторів. Дані рецептори, відомі також як DR4 і DR5 (рецептор загибелі 4 і рецептор загибелі 5), належать до сімейства рецептора TNF (фактора некрозу пухлини) і піддаються гіперекспресії з боку різних типів ракових клітин. Активація даних рецепторів може індукувати зовнішній сигнальний шлях апоптозу, незалежно від супресорного гена p53, який, завдяки активованій каспазі-8, призводить до активації виконавчих каспаз і тим самим - до деградації нуклеїнових кислот. Каспаза-8, вивільнена після активації TRAIL, може також спричинювати вивільнення Від протеїну і тим самим - непряму активацію мітохондріального шляху, при цьому Від протеїн, переміщаючись до мітохондрії, де він стимулює вивільнення цитохрому C, таким чином, опосередковано посилює апоптотичний сигнал від рецепторів загибелі.

TRAIL вибірково впливає на пухлинні клітини, по суті, не викликаючи апоптозу в здорових клітинах, які стійкі до цього протеїну. Таким чином, в силу свого величезного потенціалу, TRAIL був визнаний протираковим засобом, який впливає на широкий діапазон різних типів пухлинних клітин, в тому числі гематологічних злоякісних новоутворень і щільних пухлин, і в той же час щадним по відношенню до нормальних клітин, і таким, що має відносно невеликі побічні ефекти.

Протеїн TRAIL представляє собою протеїн мембранного типу II, що має довжину з 281 амінокислот, при цьому його позаклітинна область, яка включає амінокислотні залишки 114-281, після розщеплення протеазами утворює розчинну молекулу sTRAIL розміром 20 кДа, яка також є біологічно активною. Обидві форми TRAIL і sTRAIL здатні запустити апоптоз через взаємодію з рецепторами TRAIL, присутніми на клітинах-мішенях. Сильна протипухлинна активність і дуже низька системна токсичність розчинної частини молекули TRAIL була продемонстрована із застосуванням тестування клітинних ліній.

Крім того, клінічні дослідження людини на рекомбінантний людський розчинний TRAIL (rhTRAIL), що має амінокислотну послідовність, відповідну амінокислотам 114-281 з hTRAIL, відомий під назвою INN dulanermin (дуланермін), показали його хорошу переносимість та відсутність токсичності, що обмежує дозування.

Як нещодавно було розкрито відносно рекомбінантного мутанта з кільцевою перестановкою генів, що має відношення до 122-281hTRAIL, наприклад, в патентному документі EP 1688498, фрагмент TRAIL, коротший за 114 - 281, здатний зв'язуватися з мембранними рецепторами загибелі і індукувати апоптоз через ці рецептори.

Відома на сьогоднішній день інформація про токсичний вплив рекомбінованого протеїну TRAIL на клітини печінки, цілком ймовірно, пов'язана з наявністю модифікації, тобто маркувань поліглістидину, при цьому, немарковані TRAIL не виявляють системної токсичності.

Проте, в ході подальших наукових досліджень і розробок виявилось, що багато ракових клітин також проявляють первинну або надбану стійкість до TRAIL (див., наприклад, WO2007/022214). Хоча механізм стійкості до TRAIL до кінця не вивчений, вважається, що вона може проявлятися на різних рівнях TRAIL-індукованого шляху апоптозу, починаючи від рівня рецепторів на поверхні клітини, завершаючи рівнем виконавчих каспаз в межах сигнального шляху. Така стійкість обмежує корисність застосування TRAIL в якості протипухлинного засобу.

Крім того, в клінічних дослідженнях пацієнтів дійсна ефективність TRAIL в якості монотерапевтичного засобу виявилася низькою. Щоб подолати таку низьку ефективність і стійкість пухлин до TRAIL, були розроблені різні комбіновані лікувальні методики із застосуванням радіо-і хімотерапевтичних засобів, у результаті яких досягався синергічний апоптотичний ефект. (WO2009/002947; A. Almasan and A. Ashkenazi, Cytokine Growth Factor Reviews (Про цитокінові фактори росту) 14 (2003) 337-348; RK Srivastava, Neoplasia (Неоплазія),

Vol 3, No 6, 2001, 535-546, Soria JC et al., J. Clin. Oncology (Клінічна онкологія), Vol 28, No 9 (2010), p. 1527-1533). Використання rhTRAIL для лікування раку в поєднанні з вибраними звичайними хіміотерапевтичними препаратами (паклітаксел, карбоплатин) і моноклональними анти-VEGF - антитілами описані в документі WO2009/140469. Проте, таке поєднання обов'язково супроводжується добре відомими недоліками, що властиві традиційній хіміотерапії або променевої терапії.

Крім того, TRAIL терапія не була позбавлена проблеми, яка полягала у низькій стабільності TRAIL і його швидкому виведенні з організму після прийому.

Однією з проблем у терапії раку є також інгібування пухлинного ангиогенезу. Ангиогенез (неоваскуляризація) є патологічним, необмеженим у часі процесом розвитку нових кровоносних судин, які постачають пухлину киснем і живильними речовинами. Ангиогенез є необхідною умовою для росту і розповсюдження пухлини та сприяння утворенню її метастазів.

В терапії раку відомий позитивний ефект інгібування ангиогенезу пухлини. Були зроблені спроби клінічного застосування речовин, які інгібують або регулюють процес ангиогенезу як для терапії раку, так і додаткової терапії раку.

Відомі такі інгібітори ангиогенезу: ендогенні, тобто такі, що природно присутні в організмі людини, і численні екзогенні антиангіогенні речовини. Серед них є відомі інгібітори ангиогенезу, що нагадують протеїн, в тому числі протеолітичні фрагменти ендогенних протеїнів. В якості прикладів можуть бути згадані такі протеїнові інгібітори ангиогенезу, як ангиостатин (фрагмент плазміногену), ендостатин (С-кінцевий фрагмент колагену XVIII), кальретикулін, вазостатин - фрагмент кальретикуліну, фрагмент пролактину, фрагмент металопротеїнази 2, або тумстатин - фрагмент колагену IV (Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. (Ангиогенез модулює адипогенез і ожиріння) J Clin Invest. 2007;117(9):2362-2368, Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery (Ангиогенез: організуючі принципи відкриття нових ліків)? Nat Rev Drug Discov. 2007;6:273-286).

Наприклад, тумстатин являє собою пептид розміром 28 кДа - фрагмент колагену типу IV, здатний зв'язуватися з інтегрином $\alpha v \beta 3$ та запобігати ангиогенезу шляхом інгібування проліферації ендотеліальних клітин. Крім того, тумстатин самостійно інгібує активацію кінази фокальної адгезії (ФАК) і фосфатидилинозитол-3-кінази PI3 і протеїнкінази РКВ/Akt (ПКБ / Акт).

Антиангіогенна активність може також спричинюватися інгібуванням проангіогенних протеїнів, таких як чинник росту ендотелію судин (VEGF), який діє через рецептори, розташовані на судинному ендотелію, і який є основним стимулятором неоваскуляризації.

У клінічному лікуванні, у тому числі лікуванні раку, в якості факторів антиангіогенезу вже були застосовані певні речовини, спрямовані проти VEGF, наприклад, моноклональні антитіла бевацизумаб і ранібізумаб. Також відомі інші проангіогенні фактори, що стимулюють проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин незалежно від рецепторів, розташованих на ендотелію, до яких відносяться, наприклад, цитокіни, такі як тромбоцитарний фактор росту PDGF і епідермальний фактор росту EGF, TNF і ангиопоетин.

У процесі ангиогенезу також бере участь фермент амінопептидаза N (APN/CD13), яка являє собою трансмембранну металопротеазу. Відомо, що гальмування цього ферменту може призводити до інгібування пухлинного процесу. Відома деяка кількість природних і синтетичних інгібіторів амінопептидази N. (Bavouis B., Dauzon D., Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects (Інгібітори амінопептидази N/CD13 (EC 3.4.11.2): хімічні, біологічні дослідження і терапевтичні перспективи.) Medical Research Review, 2006, 26, (1), 88-130).

Природні інгібітори речовини APN/CD13 в основному включають до свого переліку речовини, що виробляються мікроорганізмами. В якості представника, серед інших можуть бути названі бестатин, куркумін і апігенін. Було також виявлено, що короткий пептид, що містить мотив CNGRC, здатний ефективно зв'язуватися з CD13 (Arap et al., Science, 279:377-380, 1998).

Багато які з антиангіогенних речовин в даний час знаходяться на різних стадіях дослідження, включаючи клінічні випробування. Проте, відомі терапії, спрямовані на інгібування ангиогенезу, мають багато добре відомих недоліків. Наприклад, користь від застосування моноклонального антитіла бевацизумабу при лікуванні раку молочної залози нещодавно була поставлена під сумнів. Багато антиангіогенних препаратів демонструють, наприклад, дуже короткий період напіврозпаду, низьку розчинність, незадовільну біодоступність і токсичні побічні ефекти.

Безпека антиангіогенних препаратів має особливе значення через їх тривале застосування і відсутність селективності терапії. Велика потреба в ефективній терапії і природа онкологічних захворювань вимагають спрощеної процедури реєстрації такої групи препаратів, тому неможливо знати всі побічні ефекти і недоліки препарату. Хоча, на відміну від

хіміотерапевтичних заходів, які спрямовані на всі швидко проліферуючі клітини, антиангіогенні препарати, спрямовуються на різних етапах формування кровоносних судин, що призводить до зниження токсичності терапії. Тим не менш, все ще існує необхідність протиракової терапії, направленої на інгібуванні ангіогенезу, але такої, яка при цьому забезпечувала б селективність відносно пухлинних клітин. Отже, існує потреба в нових протиракових антиангіогенних способах лікування з поліпшеними токсикологічними характеристиками.

Побудований злитий протеїн, що містить послідовності інгібітора ангіогенезу вазостатину і TRAIL114-281, що зв'язані з сайтом розщеплення лінкера металопротеази, був описаний у роботі A.I. Guo et al in Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology (Китайський журнал біохімії і молекулярної біології) 2008, vol. 24(10), 925-930, як такий, що характеризується ефектом індукування апоптозу в пухлинних клітинах.

Побудований злитий протеїн, що містить послідовності інгібітора ангіогенезу кальретикуліну і TRAIL114-281, був описаний у CN1609124A як такий, що проявляє ефект індукування апоптозу в пухлинних клітинах.

CN 1256347C розкриває злитий протеїн, що складається з кініногену D5 60-148 114-281 і TRAIL 114-281.

Побудований злитий протеїн, що містить послідовності інгібітора ангіогенезу кіностатину, вазостатину і канстатину, приєднані до N-або C-кінця TRAIL114-281, зв'язаного з лінкером, кодуючим GGGSGGSG, згадується в роботі Feng Feng-Yi "Phase and Clinical Trial of Rh-Apo2L and Apo2L-Related Experimental Study", ("Фазові і клінічні випробування експериментальних досліджень, що мають відношення до Rh-Apo2L і Apo2L"), Ph.D. degree thesis, Chinese Peking Union Medical, 2006-10-01; http://www.lw23.com/lunwen_957708432.

Побудований злитий протеїн, що містить послідовності Тумстатин 183-230 інгібітора ангіогенезу тумстатину і TRAIL114-281, був описаний як такий, що забезпечує індукцію апоптозу клітин раку підшлункової залози, в роботі N.Ren і співавторів в академічному журналі Другого військового медичного університету (N.Ren et al, Academic Journal of Second Military Medical University 2008, vol. 28(5), 676-478).

Патентний документ US2005/244370 і відповідна міжнародна публікація WO2004/035794 розкривають конструкцію TRAIL95-281 як ефекторного домену, з'єднаного пептидним лінкером з позаклітинною частиною іншого члена лігандів сімейства TNF CD40, як з клітинною поверхнею, що зв'язується з доменом. Встановлено, що активація конструкції відбувається через зв'язок з її частиною CD40

Даний винахід забезпечує вирішення поставленої технічної задачі, пропонуючи нові злиті протеїни, які містять домен, отриманий з TRAIL, і короткий домен ефекторного пептиду, що має антиангіогенну активність, але не містить фрагментів TRAIL, при цьому ефекторний пептид посилює або доповнює функцію TRAIL.

Протеїни, згідно винаходу, вибірково спрямовані до ракових клітин, де окремі елементи протеїну проявляють свою функцію, зокрема, ефекторні пептиди інгібують ангіогенез пухлини. Доставка протеїнів за винаходом в пухлинне середовище дозволяє мінімізувати токсичність відносно здорових клітин в організмі, в тому числі і побічні ефекти, а також скоротити частоту введення препаратів. Крім того, цільова терапія із застосуванням протеїнів згідно з винаходом дозволяє уникнути проблеми низької ефективності відомих раніше неспецифічних антиангіогенних терапевтичних способів, спричинюваної низькою проникністю кровоносних судин.

Крім того, виявилось, що в багатьох випадках злиті протеїни за даним винаходом є більш ефективними, ніж розчинний TRAIL і його варіанти, включаючи фрагмент послідовності. Досі відомі ефекторні пептиди, застосовані в злитому протеїні за даним винаходом, не використовувалися в медицині в такій функції через несприятливу кінетику швидкої деградації під дією неспецифічних протеаз або через накопичення в організмі, викликане відсутністю правильної послідовності активації шляхів, які необхідні щоб забезпечити належну дію ефекторного пептиду у цільовому сайті. Включення ефекторного пептиду в злитий протеїн забезпечує його селективну доставку до місця їх бажаної дії. Крім того, приєднання ефекторного пептиду збільшує масу протеїну, що призводить до більш тривалого періоду напіврозпаду і збільшення часу утримання протеїну в пухлині, а також підвищує його ефективність. Крім того, в багатьох випадках, нові злиті протеїни також пересилують резистентність відносно подолати опір TRAIL.

Опис фігур

Далі винахід описується детально з посиланнями фігури ілюстративного матеріалу.

На фіг. 1 представлено схематичне зображення структури злитих протеїнів за винаходом відповідно до Прикладів 1, 2, 3, 4, 5 і 6.

На фіг. 2 представлено схематичне зображення структури злитих протеїнів за винаходом відповідно до Прикладів 7, 8, 9, 10 і 11.

На фіг. 3 представлено схематичне зображення структури злитих протеїнів за винаходом відповідно до Прикладів 12, 13, 14 і 15.

5 На фіг. 4 показані спектри кругового дихроїзму для rhTRAIL95-281 і злитих протеїнів, що відповідають Прикладам 1, 4, 5, 9 та 14, експресованих в специфічній еліптичності.

На фіг. 5 представлено зміни обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl: CD1-Foxn1^{nu}, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 1, 4, 5 і 9 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

10 На фіг. 6 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl: CD1-Foxn1^{nu} 1, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 1, 4, 5 і 9 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

15 На фіг. 7 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:CD1-Foxn1^{nu}, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладу 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 8 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl: CD1-Foxn1^{nu} 1, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладу 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

20 На фіг. 9 представлено схематичне зображення структури злитих протеїнів за винаходом відповідно до Прикладів 16, 17, 18 і 19.

На фіг. 10 представлено зміни обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl: CD1-Foxn1^{nu}, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 5, 4, 9 і 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

25 На фіг. 11 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl: CD1-Foxn1^{nu} 1, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 5, 4, 9 і 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

30 На фіг. 12 представлено зміни обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

35 На фіг. 13 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки HCT116, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 14 представлено зміни обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки Colo205, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

40 На фіг. 15 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки Colo205, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

45 На фіг. 16 представлено зміни обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки SW620, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 17 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак товстої кишки SW620, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

50 На фіг. 18 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Cby.Cg-foxn1(nu)/J, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

55 На фіг. 19 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Cby.Cg-foxn1(nu)/J, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 20 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені NCI-H460, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 6 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 21 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені NCI-H460, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 6 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

5 На фіг. 22 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладам 5, 6, 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 23 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладам 5, 6, 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

10 На фіг. 24 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені NCI-H460-Luc2, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 5 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

15 На фіг. 25 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені NCI-H460-Luc2, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 5 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 26 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 5 і 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

20 На фіг. 27 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак легені A549, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 5 і 1 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

25 На фіг. 28 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак печінки PLC/PRF/5, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 29 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак печінки PLC/PRF/5, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

30 На фіг. 30 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак печінки HepG2, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

35 На фіг. 31 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак печінки HepG2, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

На фіг. 32 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак підшлункової залози PANC-1, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

40 На фіг. 33 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на рак підшлункової залози PANC-1, що одержали лікування злитим протеїном за винаходом, відповідним Прикладу 11 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

45 На фіг. 34 представлено зміну обсягу пухлини (у % від початкової стадії) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на людську саркому матки множинної лікарської стійкості MES-SA/Dx5, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

50 На фіг. 35 представлені значення показників уповільнення росту пухлини (% TGI) у мишей Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, хворих на людську саркому матки множинної лікарської стійкості MES-SA/Dx5, що одержали лікування злитими протеїнами за винаходом, відповідними Прикладам 6 і 19 даного винаходу, у порівнянні з rhTRAIL 114-281.

Детальний опис винаходу

Винахід відноситься до злитого протеїну, що містить:

55 домен (а), який є функціональним фрагментом послідовності розчинного протеїну hTRAIL, при цьому даний фрагмент починається амінокислотою у позиції не нижче, ніж hTRAIL 95, або до гомологу зазначеного функціонального фрагмента, який має, щонайменше, 70% ідентичність послідовності, і

домен (b), що є послідовністю антиангіогенного ефекторного пептиду, при цьому послідовність домену (b) приєднана в точці С закінчення і / або точці N закінчення домену (а).

за умови, що виключаються злиті протеїни у яких ефекторний пептид вибраний з групи, що складається з кальретикуліну, тумстатину 183-230, кініногену D5, вазостатину, кініностатину і канстатину.

5 Термін "функціональний розчинний фрагмент послідовності розчинного hTRAIL" слід розуміти як назву, що вказує на будь-який фрагмент розчинного hTRAIL, який здатний індукувати апоптотичний сигнал у клітинах ссавців після зв'язування з рецепторами на поверхні клітин.

Кваліфікованому фахівцю слід взяти до уваги, що наявність щонайменше 70% гомології TRAIL - послідовності відома з рівня техніки даної області.

10 Слід розуміти, що доменом (b) ефекторного пептиду в злитому протеїну за даним винаходом не є ані протеїн hTRAIL, ані частина або фрагмент протеїну hTRAIL.

Термін "пептид" у контексті даного винаходу слід розуміти як молекулу, сконструйовану з безлічі амінокислот, з'єднаних разом за допомогою пептидного зв'язку. Таким чином, термін "пептид" у контексті даного винаходу включає в себе поняття олігопептидів, поліпептидів і протеїнів.

У даному винаході амінокислотні послідовності пептидів будуть представлені звичайним способом, прийнятним для рівня техніки, в напрямку від точки N закінчення (N-кінця) пептиду в бік точки C його закінчення (C-кінця). Таким чином, будь-яка послідовність має свою точку N закінчення з лівого боку і точку C закінчення з правого боку її лінійного зображення.

20 Злитий протеїн за винаходом містить, принаймні, один домен (b) ефекторного пептиду, приєднаний в точці C закінчення або в точці N закінчення домену (a).

В одному з конкретних прикладів здійснення винаходу домен (a) являє собою фрагмент послідовності hTRAIL, що починається амінокислотою з діапазону від hTRAIL 95 до hTRAIL 121, включно, та закінчується амінокислотою hTRAIL 281.

25 Зокрема, домен (a) може бути вибраний з групи, що складається з послідовностей, відповідних hTRAIL 95-281, hTRAIL 119-281, hTRAIL 120-281 і hTRAIL 121-281. Для кваліфікованого спеціаліста в даній області техніки є очевидним той факт, що hTRAIL 95-281, hTRAIL 119-281, hTRAIL 120-281 і hTRAIL 121-281 являють собою фрагмент людського протеїну TRAIL, що починається амінокислотою, маркованою числом 95, 119, 120 і 121, відповідно, в відомій послідовності hTRAIL (SEQ ID NO: 16), розміщеній (депонованій) в ГенБанку (GenBank) с реєстраційним номером P50591.

30 В іншому конкретному прикладі здійснення домен (a) являє собою гомолога функціонального фрагмента послідовності розчинного протеїну hTRAIL, що починається в положенні амінокислоти не нижче hTRAIL 95 і закінчується в положенні амінокислоти hTRAIL 281, послідовність якого, принаймні на 70%, переважно на 85%, ідентична вихідній послідовності.

У конкретних варіантах даного прикладу здійснення домен (a) являє собою гомолога фрагмента, вибраного з групи, що складається з послідовностей, відповідних hTRAIL 95-281, hTRAIL 114-281, hTRAIL 116-281, hTRAIL 120-281, hTRAIL 121-281 і hTRAIL 122-281.

40 Слід розуміти, що гомолог фрагмента hTRAIL є варіацією / модифікацією амінокислотної послідовності даного фрагмента, при цьому, щонайменше, одна амінокислота змінена, включаючи 1 амінокислоту, 2 амінокислоти, 3 амінокислоти, 4 амінокислоти, 5 амінокислот, 6 амінокислот і не більше 15% амінокислот, при цьому фрагмент модифікованої послідовності зберігає функціональні ознаки послідовності hTRAIL, тобто здатність зв'язуватися з рецепторами загибелі на клітинній поверхні і індукувати апоптоз у клітинах ссавців. Модифікація амінокислотної послідовності може включати, наприклад, заміщення, делецію, скорочення та / або додавання амінокислот.

45 Переважно, гомолог фрагмента hTRAIL, що має модифіковану послідовність, демонструє модифіковану афінність до рецепторів загибелі DR4 (TRAIL-R1) або DR5 (TRAIL-R2) у порівнянні з нативним фрагмент hTRAIL.

Термін "модифікована афінність" відноситься до підвищеної афінності та / або афінності із зміненою селективністю рецептора.

Переважно, гомолог фрагмента hTRAIL, що має модифіковану послідовність, проявляє вищу афінність до рецепторів загибелі DR4 і DR5, у порівнянні з нативним фрагментом hTRAIL.

55 Особливо переважним є той факт, що гомолог фрагмента hTRAIL, який має модифіковану послідовність, проявляє більш високу афінність до рецептора загибелі DR5, у порівнянні з рецептором загибелі DR4, тобто підвищену селективність DR5/DR4.

Також переважним є те, що гомолог фрагмента hTRAIL, який має модифіковану послідовність, проявляє підвищену селективність відносно рецепторів загибелі DR4 і / або DR5 залежно від афінності до рецепторів DR1 (TRAIL-R3), та / або DR2 (TRAIL-R4).

Модифікації hTRAIL, результатом яких є підвищення ступеня спорідненості (афінності) та / або селективності відносно рецепторів загибелі DR4 і DR5, відомі кваліфікованим фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, з публікації Tur V, van der Sloot AM, Reis CR, Szegezdi E, Cool RH, Samali A, Serrano L, Quax WJ. DR4-selective tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) variants obtained by structure-based design. (Варіанти DR4-селективного апоптоз-індукуючого ліганду (TRAIL), що має відношення до фактору некрозу пухлини, отримані на основі структурного конструювання) J. Biol. Chem. 2008 Jul 18; 283 (29) :20560-8, в якій описана мутація D218H, що володіє підвищеною селективністю по відношенню до DR4, або з публікації Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP. Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. (Генерування нових TRAIL мутантів DR5-A і DR5-B з поліпшеною селективністю відносно рецептора загибелі 5, апоптоз.) 2009 Jun; 14 (6) :778-87, в якій описана мутація D269H із зниженим показником афінності до DR4.

Мутанти hTRAIL, які призводять до збільшеної афінності до одного з рецепторів DR4 і DR5, порівняно з рецепторами DR1 і DR2, і підвищеної афінності до рецептора DR5, в порівнянні з DR4, описані також в патентних документах WO2009077857 і WO2009066174.

Підходящими мутаціями є одна або декілька мутацій в позиціях нативного hTRA (I) L, вибраних з групи, що складається з 131, 149, 159, 193, 199, 201, 204, 204, 212, 215, 218 і 251 зокрема, мутації, що залучають заміщення амінокислоти основною амінокислотою, такою як лізин, гістидин і аргінін, або такою амінокислотою, як глютамінова кислота або аспарагінова кислота. Зокрема, можуть бути зазначені одна або декілька мутацій, вибраних з групи, що складається з G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, Q193H, Q193K, N199H, N199R, K201H, K201R, K204E, K204D, K204L, K204Y, K212R, S215E, S215H, S215K, S215D, D218Y, D218H, K251D, K251E і K251Q, як описано в патентній публікації WO2009066174.

Прийнятними мутаціями є також одна або декілька мутацій в позиціях нативного hTRA, вибраних з групи, що складається з 195, 269 і 214, зокрема, мутацій, які передбачають заміщення амінокислоти основною амінокислотою, такою як лізин, гістидин і аргінін. Зокрема, можуть бути зазначені одна або декілька мутацій, вибраних з групи, що складається з D269H, E195R, і T214R, як описано в патентній публікації WO2009077857

В конкретному прикладі здійснення домен (а), який являється гомологом фрагмента hTRAIL, вибирають із мутанта D218H нативної послідовності TRAIL, як описано в WO2009066174 або мутанта Y189N - R191K - Q193R - H264R - I266R - D269H нативної послідовності TRAIL, як описано в раб оті Gasparian ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Yagolovich AV, Popova EN, Sycheva AM, Moshkovskii SA, Kirpichnikov MP., Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, Apoptosis. (Генерування нових TRAIL-мутантів DR5-A і DR5-B з покращеною селективністю до рецептора 5 загибелі. Апоптоз). 2009 Jun;14(6):778-87.

Домен (b) може бути, зокрема, вибраний з наступної групи:

- інгібітори рецепторів для факторів росту, вибраних з рецепторів VEGF, PDGF і EGF;
- Тумстатин або його фрагменти, крім фрагмента 183-230, а також
- інгібітори амінопептидази N (CD13).

В групі інгібіторів рецепторів для факторів росту ефекторний пептид домену (b) може бути фрагментом людського судинного ендотеліального фактора росту VEGF, який конкурентно зв'язує рецептор VEGF з природним лігандом, при цьому сам позбавлений ангіогенної активності. Як наслідок, ангіогенна активність VEGF блокується, більше не існує стимуляції формування нових кровоносних судин, і зростання пухлини пригнічується.

Ефекторним пептидом з вказаної вище групи є, наприклад, пептид, який інгібує сигнальний шлях VEGF і, зокрема, 7-амінокислотний фрагмент людського VEGF, що представлено послідовністю SEQ ID NO: 17 у доданому списку послідовностей.

Вважається, що пептид, який містить послідовність гептапептиду VEGF, включену в злитий протеїн за винаходом, має ефективно усувати ракові клітини шляхом інгібування процесу ангіогенезу.

Крім того, у групі інгібіторів рецепторів для факторів росту ефекторним пептидом домену (b) може бути фрагмент тромбоцитарного фактора росту PDGF, який конкурентно зв'язує рецептор PDGF з природним лігандом, при цьому сам позбавлений ангіогенної активності. Як наслідок, ангіогенна активність PDGF блокується, більше не існує стимуляції формування нових кровоносних судин, і зростання пухлини пригнічується.

Зокрема, таким ефекторним пептидом є 19-амінокислотний пептид - фрагмент ліганду PDGF, представлений послідовністю SEQ ID NO: 22 у доданому списку послідовностей.

Вважається, що пептид, який містить послідовність протеїнового фрагмента тромбоцитарного фактору росту PDGF, включену в злитий протеїн за винаходом, має ефективно усувати ракові клітини шляхом інгібування процесу ангиогенезу.

Крім того, у групі інгібіторів рецепторів для факторів росту антиангіогенним ефекторним пептидом домену (b) може бути пептидний фрагмент епідермального фактору росту EGF, який конкурентно зв'язує рецептор EGF з природним лігандом, при цьому сам позбавлений ангиогенної активності. Як наслідок, ангиогенна активність EGF блокується, більше не існує стимуляції формування нових кровоносних судин, зростання пухлини пригнічується.

Таке блокування пептидів Gly Leu Arg Ser Lys Leu Glu i Arg Gly Leu Leu Arg Ser Glu, здатних зв'язуватися з рецептором EGF без активації внутрішньоклітинної кінзи і блокувати EGR активність, відоме, наприклад, з патентного документу EP0641358. Зокрема, такий ефекторний пептид - фрагмент ліганду EGF, показано послідовністю SEQ ID NO: 23 у доданому списку послідовностей.

Вважається, що пептид, який містить послідовність епідермального фактору росту EGF, включену в злитий протеїн за винаходом, має ефективно усувати ракові клітини шляхом інгібування процесу ангиогенезу.

У групі тумстатину і його фрагментів ефекторним пептидом домену (b) може бути 25-амінокислотний протеїновий фрагмент тумстатин (фрагмент I), представлений послідовністю SEQ ID NO: 18 у доданому списку послідовностей. Ефекторним пептидом вказаної вище групи є також інший 18-амінокислотний протеїновий фрагмент тумстатин (фрагмент II), представлений послідовністю SEQ ID NO: 19 у доданому списку послідовностей. Антиангіогенним ефекторним пептидом домену (b) може бути також комбінація пептидних фрагментів тумстатину, зокрема фрагменту I і фрагменту II, розташованих поруч один з одним у будь-якому порядку. В одному з прикладів здійснення винаходу домен (b) являє собою комбінацію типу фрагмент I / фрагмент II (SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 19) або комбінацією типу фрагмент II / фрагмент I (SEQ ID NO:19/SEQ ID NO: 18).

Вважається, що пептид, який містить послідовність протеїнового фрагмента I / II тумстатину, включену в злитий протеїн за винаходом, має ефективно усувати ракові клітини шляхом інгібування процесу ангиогенезу.

Група інгібіторів амінопептидази N/CD13, які зв'язують з ферментом амінопептидазою N/CD13, з метою забезпечення її активності, буде включати в себе короткі пептиди, що містять мотиви NGR або RGD.

Пептиди, в тому числі мотиви NGR, які ефективно зв'язуються з амінопептидазою N, описані, наприклад, у роботі Arap et al., Science, 279:377-380, 1998. На позаклітинному домені амінопептидази N також присутній фрагмент, який має афінність до мотиву RGD.

Обидва мотиви (RGD і NGR) зв'язуються як антагоністи з факторами, що залучені у процес неоваскуляризації. Таким чином, цілком імовірно, що мотив RGD, який нагадує мотив NGR, буде зв'язуватися з амінопептидазою N і діяти як її інгібітор (Friedlander et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct α v integrins. (Визначення двох ангиогенних шляхів окремими α v інтерпінами) Science (Washington DC), 270: 1500-1502, 1995; Pasqualini et al Amino peptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. (Амінопептидаза N як рецептор для пептидів пухлини самонаведення і мішень для інгібування ангиогенезу) Cancer Res. 2000 Feb 1;60(3):722-7).

У групі інгібіторів амінопептидази N/CD13 антиангіогенним ефекторним пептидам домену (b) може бути 5-амінокислотний пептид, зв'язаний з CD13, як показано послідовністю №21 у доданому переліку послідовностей.

Вважається, що пептид, який містить послідовність протеїнового фрагмента, що зв'язує з амінопептидазою N/CD13, включену в злитий протеїн за винаходом, має ефективно усувати ракові клітини шляхом інгібування процесу ангиогенезу.

Злиті протеїни за винаходом можуть містити більше одного домену (b) ефекторного пептиду, зокрема, два або три домени (b). В одному з прикладів здійснення злитий протеїн за даним винаходом містить два однакових або різних ефекторних домени (b), вибраних з SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 і SEQ ID NO: 23, причому ефекторні домени (b) розташовані поруч один з одним. В іншому прикладі здійснення злитий протеїн за даним винаходом містить два однакових або різних ефекторних домени (b), вибраних з SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 і SEQ ID NO: 23, при цьому ефекторні домени (b) розташовані на N-кінці і / або C-кінці домену (a).

У одному з прикладів здійснення злитий протеїн за даним винаходом містить три ефекторні домени .

Наприклад, злитий протеїн за винаходом містить пептид, похідний від VEGF (SEQ ID NO: 17), розміщений на N-кінці домену (а), а на C-кінці домену (а) розташовані фрагмент I тумстатину (SEQ ID NO: 18) і фрагмент II тумстатину (SEQ ID NO: 19), розміщені поруч один з одним. В окремих прикладах здійснення злитого протеїну за винаходом ефекторним пептидом

являється пептид, що має антиангіогенну активність, вибраний з групи, до складу якої входять SEQ ID NO: 17 (гептипептид, похідний від VEGF), SEQ ID NO: 18 (фрагмент I (амінокислоти 74-98) протеїну тумстатину), SEQ ID NO: 19 (фрагмент II (амінокислоти 197-214) протеїну тумстатину), SEQ ID NO: 20 (пептид, що зв'язується з CD13), SEQ ID NO: 21 (пептид, що зв'язується з CD13), SEQ ID NO: 22 (фрагмент PDGF) і SEQ ID NO: 23 (фрагмент EGF).

Після зв'язування з TRAIL-рецепторами, присутніми на поверхні ракових клітин, злитий протеїн надаватиме подвійної дії. Домен (а), що є функціональним фрагментом TRAIL або його гомологом із збереженням функціональності, буде проявляти свою відому агоністичного активність - тобто зв'язуватися з рецепторами загибелі на поверхні клітини і здійснювати активацію зовнішнього шляху апоптозу. Після інтерналізації злитого протеїну, що містить антиангіогенний пептид, домен (b), потенційно, зможе надавати внутрішньоклітинного впливу паралельно з діяльністю домену TRAIL. Таким чином, протиракова активність TRAIL може бути посилена шляхом активації інших елементів і механізмів, - таких як стеричне інгібування зв'язування природних лігандів VEGF, PDGF та EGF, інгібування ангіогенезу і неоваскуляризації, інгібування активації фосфатидилинозитол-3-кінази, протеїнкінази B (PKB / Akt) або опосередкованої стимуляції гіперекспресії TRAIL через кіназу Akt і шлях NFκ.

В одному з варіантів здійснення винаходу домен (а) і домен (b) зв'язані між собою, принаймні, одним доменом (с), що містить послідовність сайту розщеплення, розпізнаного протеазами, присутніми в клітинному середовищі, особливо в пухлинній клітині. З'єднання домену (а) з доменом (b), принаймні, одним доменом (с) означає, що між доменами (а) і (b) можуть бути присутніми більше одного домену (с), зокрема, один або два доменів (с).

Протеазний сайт розщеплення може бути вибраний з наступного переліку, що включає:

- послідовність, розпізнану металопротеазою MMP, зокрема, (Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro/PLGLAGEP), позначену як SEQ ID NO: 24, або (Pro Leu Gly Ile Ala Gly Glu /PLGIAGE), позначену як SEQ ID NO: 55, або (Pro Leu Gly Leu Ala Gly GluPro /PLGLAGEP), позначену як SEQ ID NO: 56;

- послідовність, розпізнану урокіназою uPA, зокрема, послідовність ArgValValArg (RVVR - у однобуквену вираженні) позначену як SEQ ID NO: 25, або її фрагмент, що з останньою амінокислотою послідовності, до якої він приєднаний, формує послідовність SEQ ID NO: 25, та їх комбінації.

В одному з прикладів здійснення винаходу сайт розщеплення протеазою являє собою комбінацію послідовності, розпізнаної металопротеазою MMP, і послідовності, розпізнаної урокіназою uPA, розташованих поруч одна з одною у будь-якому порядку.

В одному з прикладів здійснення домен (с) являє собою комбінацію MMP/uPA SEQ ID NO:24/SEQ.No.25, або комбінацію uPA/MMP SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 24.

В іншому прикладі здійснення домен (с) являє собою комбінацію MMP/uPA SEQ ID NO:55/SEQ.No.25, або комбінацію uPA/MMP SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 55.

Ще в одному прикладі здійснення домен (с) являє собою комбінацію MMP/uPA SEQ ID NO:56/SEQ.No.25, або комбінацію uPA/MMP SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 56.

Такі протеази, як металопротеаза MMP і урокіназа uPA піддаються гіперекспресії в пухлинному середовищі. Наявність послідовності, розпізнаної протеазою, забезпечує відщеплення домену (а) від домену (b), тобто секретування функціонального домену (b) і, отже, його активацію.

Наявність сайту розщеплення протеазою, завдяки забезпеченню швидкого спливу ефекторного пептиду, підвищує можливості перенесення пептиду до місця його дії ще до того моменту, коли може відбутися випадкова деградація злитого протеїну через протеази, присутні в клітині.

Крім основних функціональних елементів злитого протеїну, домену (доменів) сайту розщеплення, злиті протеїни, згідно винаходу, можуть включати нейтральну послідовність / послідовності гнучкого стеричного гліцин-серин-аланінового лінкера (спейсера). Такі лінкери / спейсери, добре відомі і описані в літературі. Їх включення в послідовність злитого протеїну призначено для забезпечення правильного укладання протеїнів, що продукуються в процесі його гіперекспресії в клітинах-хазяїнах.

Зокрема, гнучкий стеричний лінкер може бути обраний з групи, що складається з SEQ ID NO: 26 і SEQ ID NO: 27, які є комбінаціями залишків гліцину, цистеїну і аланіну. В іншому прикладі здійснення гнучкий стеричний лінкер може бути обраний з групи, що складається з

SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 і SEQ ID NO: 54, які містять залишки гліцину і серину. Крім того, гнучким стеричним лінкером може бути будь-який фрагмент з послідовностей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 і SEQ ID NO: 54, що функціонує як гнучкий стеричний лінкер, наприклад, фрагмент Gly Gly Gly /GGG або фрагмент Gly Gly/GG.

5 В одному з прикладів здійснення гнучкий стеричний лінкер може бути також вибраний з одного амінокислотного залишку, наприклад, одного залишку глютамінової кислоти, цистеїну, серину, проліну або залишку гліцину.

В іншому прикладі здійснення гнучкий стеричний лінкер може бути будь-якою комбінацією лінкерів, що складається з SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 54 і одних амінокислотних залишків залишку глютамінової кислоти, цистеїну, серину, проліну або гліцину.

10 Конкретними прикладами здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злиті протеїни, що містять антиангіогенний пептид, вибраний з групи, що складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 і SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 48, що в якості ефекторного пептиду включають в себе гептапептид, отриманий з VEGF.

15 Іншим конкретним прикладом здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злитий протеїн, що містить антиангіогенний пептид, вибраний з групи, що складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 8, що в якості ефекторного пептиду включають в себе послідовності зв'язування з CD13.

20 Іншим конкретним прикладом здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злитий протеїн, що містить антиангіогенний пептид, вибраний з групи, що складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 49, що в якості ефекторного пептиду включають в себе фрагмент PDGF.

25 Ще одним конкретним прикладом здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злитий протеїн, що містить антиангіогенний пептид, вибраний з групи, що складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 12 і SEQ ID NO: 13, що в якості ефекторного пептиду включають в себе фрагменти I і II тумстатину.

30 Іншим конкретним прикладом здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злитий протеїн, що містить антиангіогенний пептид, вибраний з групи, що складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15, що в якості ефекторного пептиду включають в себе фрагмент EGF.

35 Ще одними конкретними прикладами здійснення злитого протеїну за даним винаходом є злиті протеїни, що містять антиангіогенний пептид, вибраний з групи, яка складається з протеїнів, представлених SEQ ID NO: 3, що в якості ефекторного пептиду включають в себе гептапептид, похідний від VEGF, фрагмент I пептиду тумстатину і фрагмент II пептиду тумстатину.

Детальний опис структури прикладів злитих протеїнів, що були згадані вище, показані на фіг.1-3 і на фіг. 9 і в прикладах, представлених далі по тексту.

40 Відповідно до даного винаходу, термін "злитий протеїн" означає одиночну молекулу протеїну, що містить два або більше протеїнів чи їх фрагментів, ковалентно зв'язаних за допомогою пептидного зв'язку в межах їх відповідних пептидних ланцюгів без додаткових хімічних лінкерів.

45 В якості альтернативи, злитий протеїн може бути описаний як узагальнений образ структури протеїну або химерний протеїн. Відповідно до даного винаходу, терміни "узагальнений образ структури" або "химерний протеїн", якщо вони використовуються, слід розуміти як такий, що відноситься до злитого протеїну, як визначено вище.

Для кваліфікованого фахівця в даній галузі техніки, є очевидним, що злитий протеїн, визначений таким чином, може бути синтезований відомими методами хімічного синтезу пептидів і протеїнів.

50 Злитий протеїн може бути синтезований з використанням методів хімічного синтезу пептидів, зокрема, із застосуванням способів синтезу пептидів у твердій фазі, використовуючи відповідні смоли в якості носіїв. Такі методи є традиційними і відомі з рівня техніки, зокрема, вони описані в таких монографіях як, наприклад, Bodanszky and Bodanszky, The Practice of Peptide Synthesis (Застосування пептидного синтезу на практиці), 1984, Springer-Verlag, New York, Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis (Твердофазний пептидний синтез), 2nd Edition, 1984, Pierce Chemical Company

55 Злитий протеїн може бути синтезований із застосуванням методів хімічного синтезу пептидів як безперервний протеїн. Крім того, окремі фрагменти (домени) протеїну можуть бути синтезовані індивідуально, а потім об'єднані разом в один безперервний пептид за допомогою

пептидного зв'язку шляхом конденсації аміно - кінця одного пептидного фрагмента із карбоксильного кінця другого пептиду. Такі методи є традиційними і добре відомі з рівня техніки.

Для перевірки структури отриманого пептиду можуть бути використані відомі методи аналізу амінокислотного складу пептидів, наприклад, метод мас-спектрометрії високої роздільної здатності для визначення молекулярної ваги пептидів. Для підтвердження пептидної послідовності можуть бути також використані секвенсори протеїну, які послідовно руйнують пептид і ідентифікують послідовність амінокислот.

Однак, переважно, злитий протеїн за винаходом є рекомбінантним протеїном, генерованим методами генної експресії полінуклеотидної послідовності, що кодує злитий протеїн в клітинах-хазяїнах.

Ще одним аспектом винаходу є полінуклеотидна послідовність, зокрема, послідовності ДНК, що кодує злитий протеїн, як зазначено вище

Переважно, полінуклеотидною послідовністю, зокрема ДНК, відповідно до винаходу, що кодує злитий протеїн, як зазначено вище, є послідовність, яка оптимізована для експресії в *E. coli*.

Іншим аспектом винаходу є також вектор експресії, що містить полінуклеотидну послідовність, зокрема, послідовність ДНК за винаходом, як визначено вище.

Ще одним аспектом винаходу є також клітина - господар, що містить вектор експресії, як описано вище.

Переважною клітиною-господарем для експресії злитих протеїнів за винаходом є клітина *E. coli* (клітина кишкової палички).

Способи генерування рекомбінантних протеїнів, у тому числі злитих протеїнів, добре відомі. Якщо говорити коротко, даний спосіб полягає в генеруванні полінуклеотидної молекули, наприклад молекули ДНК, що кодує амінокислотну послідовність цільового протеїну і спрямовує експресію цільового протеїну в клітині – хазяїні. Далі цільовий протеїн, що кодує полінуклеотидну молекулу, інкорпують у відповідний вектор експресії, який забезпечує ефективну експресію поліпептиду. Далі рекомбінантний вектор експресії вводять в клітини-хазяїни для трансфекції / трансформації, і, як наслідок, виробляють трансформовану клітину-хазяїна. Після цього цільовий протеїн піддають гіперекспресії, застосовуючи культуру трансформованих клітин, забезпечують очищення отриманих протеїнів, і, за вибором, відділяють шляхом відщеплення марковані послідовності, застосовані для експресії або очищення протеїну.

Придатні для застосування способи експресії і очищення описані, наприклад, в монографії Goeddel, *Gene Expression Technology, Methods in Enzymology* (Технологія генної експресії, методи ензимології) 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), and A. Staron et al., *Advances Mikrobiol.*, 2008, 47, 2, 1983-1995.

В якості векторів експресії для впровадження і тиражування послідовностей ДНК в клітинах-хазяїнах можуть бути використані косміди, плазміди або модифіковані віруси. Зазвичай, в якості векторів експресії використовують плазміди. Відповідні для цієї мети плазміди добре відомі і комерційно доступні.

Вектор експресії за винаходом включає полінуклеотидну молекулу, що кодує злитий протеїн за винаходом і необхідні регуляторні послідовності для транскрипції і трансляції кодуєчої послідовності, інкорпорованої в підходящу клітину-хазяїна. Вибір регуляторних послідовностей залежить від типу клітин-хазяїнів і може бути легко здійснений кваліфікованим фахівцем в даній області. Прикладами таких регуляторних послідовностей є транскрипційний промотор і енхансер (підсилювач) або РНК - полімераза - зв'язувальна послідовність, рибосома - зв'язувальна послідовність, що містить сигнал ініціації транскрипції, вбудований перед кодуєчою послідовністю, і послідовність закінчення транскрипції, вбудовану після кодуєчої послідовності. Крім того, в залежності від клітини-хазяїна і застосованого вектора, в вектор експресії можуть бути введені інші послідовності, такі як джерело реплікації, додаткові ділянки рестрикції ДНК, підсилювачі (енхансери) і послідовності, що забезпечують індукування транскрипції.

Вектор експресії також буде включати послідовність маркерного гена, який надає визначеного фенотипу трансформованій клітині і створює можливість для специфічної селекції трансформованих клітин. Крім того, вектор може також містити другу маркерну послідовність, яка дозволяє відрізнити клітини, трансформовані рекомбінантною плазмідною, що містить вбудовану кодуєчу послідовність цільового протеїну, від тих, які прийняли плазмиду без інсерту (вставки). Найчастіше використовуються типові маркери стійкі до антибіотиків, однак, можуть бути використані будь-які інші репортерні гени, відомі з рівня техніки, чия присутність в клітині (*in vivo*) може бути легко визначена з використанням методів авторадіографії,

спектрофотометрії або біо-та хемілюмінесценції. Наприклад, в залежності від клітини-хазяїна, можуть бути використані такі репортерні гени, як β -галактозидаза, β -глюкуронідаза, люціфераза, хлорамфенікол ацетилтрансфераза або зелений флуоресцентний протеїн.

Крім того, вектор експресії може містити сигнальну послідовність, транспортуючу протеїни у відповідний клітинний компартмент, наприклад, періплазму, де полегшується утворення складчастості. При цьому, може бути присутньою послідовність, яка кодує мітку / тег, така як HisTag, прикріплена до точки N закінчення, або GST, прикріплена до точки C закінчення, що полегшує подальше очищення протеїну, яке відбувається з використанням принципу афінності, за допомогою афінної хроматографії на нікелевій колонці. Також можуть бути присутніми додаткові послідовності, які захищають протеїни від протеолітичної деградації в клітинах-хазяїнах, а також послідовності, які підвищують його розчинність.

Допоміжний елемент, приєднаний до послідовності цільового протеїну, може блокувати її діяльність, або чинити несприятливий вплив з іншої причини, наприклад, через токсичність. Такий елемент повинен вилучатися, що може бути досягнуто шляхом ферментативного або хімічного розщеплення.

Зокрема, шестигістидиновий маркер (ter) HisTag або інші маркери зазначеного типу, приєднані для забезпечення очищення протеїну за допомогою афінної хроматографії, повинні бути видалені, через уже описаний вплив на печінкову токсичність розчинного протеїну TRAIL. Можуть бути використані гетерологічні системи експресії на основі різних відомих клітин-хазяїнів, в тому числі прокаріотичних клітин: бактеріальних клітин, таких як кишкова паличка (*Escherichia coli*) або сінна паличка (*Bacillus subtilis*), дріжджі, такі як *Saccharomyces cerevisiae* або *Pichia pastoris* (пекарські дріжджі), і еукаріотичні клітинні лінії (комахи, ссавців, рослин).

Переважаю, завдяки простоті культивування та генетичних маніпуляцій, а також великій кількості отриманого продукту, використовується система експресії *E. coli* (кишкової палички).

Відповідно, полінуклеотидна послідовність, що містить цільову послідовність, яка кодує злитий протеїн за винаходом, буде оптимізована для експресії в *E. coli*, тобто в кодуючій послідовності вона буде містити кодони, оптимальні для експресії в *E. coli*, вибрані з можливих варіантів послідовностей, відомих з рівня техніки. Крім того, вектор експресії буде містити описані вище елементи, що підходять для *E. coli*, приєднані до кодуючої послідовності.

Таким чином, у переважному прикладі здійснення винаходу полінуклеотидна послідовність, що містить послідовність, яка кодує злитий протеїн за винаходом, оптимізований для експресії в *E. coli*, вибрана з групи полінуклеотидних послідовностей, що складається з: SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53

які кодують злитий протеїн, що має амінокислотну послідовність, відповідну до амінокислотної послідовності, вибраної з групи, яка складається з наступних амінокислотних послідовностей, відповідно:

SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48 і SEQ ID NO: 49.

У переважному прикладі здійснення винахід також забезпечує вектор експресії, придатний для трансформації *E. coli*, що містить полінуклеотидну послідовність, вибрану з групи полінуклеотидних послідовностей від SEQ ID NO: 31 до SEQ ID NO: 45 і від SEQ ID NO: 50 до SEQ ID NO: 53, зазначених вище, а також клітину *E. coli*, трансформовану таким вектором експресії.

Трансформація, тобто введення послідовності ДНК в бактеріальні клітини-хазяїни, зокрема, *E. coli* (кишкову паличку), як правило, здійснюється на компетентних клітинах, приготованих для сприйняття ДНК, наприклад, шляхом обробки іонами кальцію при низькій температурі (4° C), з подальшим впливом із застосуванням теплового шоку (при 37-42° C), або методом електропорації. Такі способи добре відомі і, як правило, визначаються виробником системи експресії або описані в літературі та в навчальних посібниках для проведення лабораторних робіт, наприклад, Maniatis et al., *Molecular Cloning* (Молекулярне клонування). Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.

Процедура гіперекспресії злитих протеїнів за даним винаходом у системі експресії *E. coli*, буде описана нижче.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що містить злитий протеїн за винаходом, як визначено вище, в якості активного інгредієнта, а також відповідний фармацевтично прийнятний носій, розріджувач та звичайні допоміжні компоненти.

Фармацевтична композиція має містити ефективну кількість злитого протеїну за винаходом і фармацевтично прийнятні допоміжні компоненти, розчинені або дисперговані у носії або розріджувачі, і бажано, фармацевтична композиція має бути представлена виконаною в стандартній лікарській формі у вигляді дозувальної одиниці або у вигляді препарату, що містить безліч доз.

Фармацевтичні форми і методи їх приготування, а також інші компоненти, носії та розріджувачі відомі кваліфікованим фахівцям і описані в літературі. Наприклад, вони описані в монографії Remington's Pharmaceutical Sciences, ed. 20, 2000, Mack Publishing Company, Easton, USA.

Термін "фармацевтично прийнятний носій, розріджувач та допоміжний інгредієнт" включає будь-які розчинники, дисперсійні середовища, поверхнево-активні речовини, антиоксиданти, стабілізатори, консерванти (наприклад, антибактеріальні засоби, протигрибкові препарати), ізотонічні агенти, відомі з рівня техніки. Фармацевтична композиція за винаходом може містити різні типи носіїв, розріджувачів та наповнювачів, в залежності від обраного способу введення і різних лікарських форм, таких як рідкі, тверді і аерозольні форми для орального, парентерального, інгаляційного, місцевого (зовнішнього) застосування, при цьому, обрана форма повинна бути стерильною при її введенні методом ін'єкції. Кращим шляхом введення фармацевтичної композиції за винаходом є парентеральний шлях, в тому числі із застосуванням маршрутів ін'єкції, таких як внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний, внутрішньочеревний, внутрішньопухлинний, також шлях або одноразового, або безперервного внутрішньовенного вливання.

В одному з прикладів здійснення фармацевтична композиція за винаходом може бути введена шляхом ін'єкції безпосередньо в пухлину. В іншому прикладі здійснення фармацевтична композиція за винаходом може бути введена внутрішньовенно. Ще в одному прикладі здійснення фармацевтична композиція за винаходом може бути введена підшкірно або інтраперитонеально (внутрішньочеревно).

Фармацевтичною композицією для парентерального введення може бути розчин або дисперсія в фармацевтично прийнятному водному або неводному середовищі, що містить буферний розчин для забезпечення відповідного показника рН та є ізоосмотичним щодо рідин організму, в разі необхідності, а також може містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні агенти і розчинні речовини, які роблять композицію сумісною з тканинами чи кров'ю реципієнта. Іншими компонентами, які можуть бути включені в композицію, є, наприклад, вода, спирти, такі як етанол, полііоли, такі як гліцерин, пропіленгліколь, рідкий поліетиленгліколь, ліпіди, такі як тригліцериди, рослинні олії, ліпосоми. Відповідна плинність і розмір часток вказаної речовини може бути забезпечена за рахунок покривних речовин, таких як лецитин і поверхнево-активні речовини, наприклад, гідроксипропілцелюлози полісорбати, і інших подібних речовин. Підходящими ізотонічними (isotoning) засобами для парентеральних рідких композицій, являються, наприклад, цукри, такі як глюкоза, і хлорид натрію, а також їх комбінації.

Крім того, фармацевтична композиція для введення шляхом ін'єкції або інфузії, може бути приготована у вигляді порошку, наприклад, у вигляді ліофілізованого порошку, що розводиться безпосередньо перед використанням у відповідному носії, такому як, наприклад, стерильна апірогенна вода.

Фармацевтична композиція за винаходом для парентерального введення в організм може також мати форму, придатну для інтраназального введення, в тому числі, вона може бути приготована у вигляді розчинів, спреїв або аерозолів. Переважно, форма для інтраназального введення представлена у вигляді водного розчину і є ізотонічною або містить буферний розчин для підтримання показника рН від приблизно 5,5 до приблизно 6,5, щоб забезпечувати характеристики композиції аналогічними за своїми ознаками виділенням з носа. Крім того, композиція містить консерванти або стабілізатори, наприклад, такі як у відомих інтраназальних препаратах.

Композиція може містити різні антиоксиданти, які уповільнюють окислення одного або декількох компонентів. Крім того, з метою запобігання дії мікроорганізмів, композиція може містити різні антибактеріальні і протигрибкові засоби, в тому числі, наприклад, і не обмежуючись названим, парабени, хлорбутанол, тімеросал, сорбінова кислота, і подібні відомі речовини зазначеного типу.

Загалом, фармацевтична композиція за винаходом може включати, наприклад, щонайменше, близько 0,01% за вагою активного інгредієнта. Зокрема, композиція може містити активний інгредієнт у кількості від 1% до 75% за вагою одиниці композиції або, наприклад, від 25% до 60% за вагою, але не обмежуючись зазначеними значеннями.

Фактична кількість дози композиції за даним винаходом, введена пацієнтам, включаючи людину, має визначатися фізичними і фізіологічними факторами, наприклад, такими як вага тіла, тяжкість стану хворого, вид захворювання, яке лікують, попередні або супутні терапевтичні втручання і спосіб введення композиції. Підходяща одинична доза, загальна доза та концентрація активного інгредієнта в композиції повинна визначатися лікарем.

Композиція може, наприклад, вводиться при дозуванні від близько 1 мкг / кг маси тіла до, приблизно, 1000 мг / кг маси тіла пацієнта, наприклад, в діапазоні від 5 мг / кг маси тіла до 100 мг / кг маси тіла або в діапазоні від 5 мг / кг маси тіла до 500 мг / кг маси тіла.

Злитий протеїн і композиції, що його включають, проявляють протиракову або протипухлинну активність і можуть бути використані для лікування ракових захворювань.

Винахід також відноситься до застосування злитого протеїну за винаходом, як визначено вище, для лікування онкологічних захворювань у ссавців, включаючи людину.

Винахід також відноситься до способу лікування онкологічних захворювань у ссавців, у тому числі людини, що включає введення пацієнту, потребуючому такого лікування, протиракової ефективною кількості злитого протеїну за винаходом, як визначено вище, опційно, у вигляді відповідної фармацевтичної композиції.

Злитий протеїн за винаходом може бути використаний для лікування гематологічних злоякісних новоутворень, таких як лейкомія, гранулематоз, мієлома та інших гематологічних злоякісних новоутворень. Злитий протеїн також може бути використаний для лікування щільних пухлин, таких як рак молочної залози, рак легені, в тому числі недрібноклітинний рак легені, рак товстої кишки, рак підшлункової залози, рак яєчників, рак сечового міхура, рак простати, рак нирки, рак мозку тощо.

Відповідним шляхом введення злитого протеїну при лікуванні раку, зокрема, являється парентеральний шлях, який полягає у введенні злитого протеїну за винаходом у вигляді ін'єкцій або інфузій (вливань), застосовуючи композицію і форму, прийнятну для такого шляху введення.

Винахід більш детально розкрито в описі наступних загальних процедур і прикладів специфічних злитих протеїнів.

Загальна процедура гіперекспресії злитого протеїну

Приготування плазмиди

Амінокислотна послідовність цільового злитого протеїну була використана в якості шаблону для генерування кодуєчої його послідовності ДНК, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *Escherichia coli* (кишковій паличці). Така процедура дозволяє збільшити ефективність наступної операції синтезу цільового протеїну в *Escherichia coli* (кишковій паличці). Далі була автоматично синтезована результуюча нуклеотидна послідовність. Крім того, сайти розщеплення ферментів рестрикції NdeI (на 5'-кінці ведучої нитки) і XhoI (на 3'-кінці ведучої нитки) були додані до результуючого гену, що кодує цільовий протеїн. Вони були використані для клонування гену у векторі pET28a (Novagen).

Вони також можуть бути використані для клонування гену, що кодує протеїн для інших векторів. Цільовий протеїн, експресований з даної структури, може бути забезпечений за вибором на N-кінці полігістидиновим тегом (шість гістидинів), якому передує ділянка, розпізнана (активізована) тромбіном, що згодом застосовується для його очищення за допомогою афінної хроматографії. Деякі цілі були експресовані без будь-яких тегів, зокрема без гістидину (histidine tag), і вони були очищені на SP Sepharose.

Коректність отриманої структури була підтверджена, по-перше, дослідженням рестрикції виділених плазмід із застосуванням ферментів NdeI і XhoI, а потім автоматичним секвенуванням усієї рамки зчитування цільового протеїну. Праймери, використані для секвенування, стали доповненням до послідовностей промотора T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') і термінатора T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), присутніх у векторі. Результуюча плазміда була використана для гіперекспресії цільового злитого протеїну в комерційному штамі *E. coli*, який був трансформований у відповідності до рекомендацій виробника. Колонії, отримані на селективному середовищі (LB агар, канаміцин (50 мкг / мл), 1% розчин глюкози), були використані для приготування нічної культури в рідкому середовищі LB, доповнені канаміцином (50 мкг / мл) і 1% глюкозою. Через 15 годин росту, культури, отримані в перемішувальному інкубаторі, були застосовані для інокуляції відповідної культури.

Гіперекспресія і очищення злитих протеїнів – загальна процедура А

LB середовище з канаміцином (30 мкг / мл) і 100 мкМ (UM) сульфату цинку інокулювали нічною культурою. Культуру інкубували при 37° С до тих пір, поки оптична щільність (OD) при 600 нм не досягала 0,60-0,80. Потім додавали IPTG до отримання кінцевої концентрації в діапазоні 0,25-1мМ. Після перемішувальної інкубації (3,5 – 20год.) при 25° С культуру

центрифугували протягом 25 хв. при 6000g). Бактеріальні гранули повторно суспендували в буфері, що містить 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 10 мМ імідазолу, рН 7,4. Суспензію обробляли ультразвуком на льоду протягом 8 хвилин (40% - амплітуда, 15-секундний імпульс, інтервал 10с) Отриманий екстракт освітлювали центрифугуванням протягом 40 хвилин при 20000 g, 4° С.

5 Смолу Ni-Sepharose (Ni-Сефарози) (GE Healthcare) попередньо обробляли методом урівноваження буфером, який використовували для приготування екстракту бактеріальних клітин. Далі смолу інкубували протягом ночі при 4° С з супернатантом, отриманим після центрифугування екстракту. Далі її завантажували в хроматографічну колонку і промивали від 15 до 50 об'ємами буфера 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 20 мМ імідазолу, рН 7,4.

10 Отриманий протеїн елюїрували з колонки з використанням градієнту імідазолу в буфері 50 мМ KH_2PO_4 з 0,5 М NaCl , рН 7,4. Одержані фракції досліджували (аналізували) за допомогою SDS-PAGE. Відповідні фракції об'єднували і діалізували протягом ночі при 4° С проти 50 мМ Тріс-буфера, рН 7,2, 150 мМ NaCl , 500 мМ L-аргініну, 0,1 мМ ZnSO_4 , 0,01% Твін (Твін) 20, і в той же час HisTag (при наявності) розщеплювали тромбіном (1:50). Після розщеплення тромбін був відділений від цільового злитого протеїну, завдяки використанню смоли Benzamidine Sepharose™. Чистоту продукту досліджували із застосуванням SDS-PAGE - електрофорезу [Maniatis et al, Molecular Cloning. (Молекулярне клонування) Cold Spring Harbor, NY, 1982].

Гіперекспресія і очищення злитих протеїнів – загальна процедура В

20 LB середовище з канаміцином (30 мкг / мл) і 100 мкМ сульфату цинку було інокульоване нічною культурою. Культуру інкубували при 37° С до тих пір, поки оптична щільність (OD) при 600 нм не досягала 0,60-0,80. Далі додавали IPTG до отримання кінцевої концентрації в діапазоні 0,5-1мМ. Після 20 - годинної перемішувальної інкубації при 25° С культуру центрифугували протягом 25 хв. при 6000 g. Після гіперекспресії бактеріальні клітини були зруйновані у френч-пресі у буфері, що містив 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 10 мМ імідазолу, 5мМ бета-меркаптоетанолу, 0,5 мМ PMSF (фенілметилсульфоніл флуориду (фториду), рН 7,8. 25 Отриманий екстракт освітлювали центрифугуванням протягом 50 хвилин при 80000 g. Смолу Ni-Sepharose (Ni-сефарозу) інкубували протягом ночі з отриманим супернатантом. Після цього смолу зі зв'язаним протеїном упаковували в хроматографічну колонку. Для вимивання фракцій, що містять незв'язувальні протеїни, колонку промивали від 15 до 50 об'ємами буфера 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 10 мМ імідазолу, 5 мМ бета-меркаптоетанолу, 0,5 мМ PMSF (фенілметилсульфоніл флуориду (фториду), рН 7,8. Далі, щоб вимити більшість протеїнів, специфічно зв'язуючих із шаром (постіллю), колонку промивали буфером, що містить 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5 М NaCl , 500 мМ імідазолу, 10% гліцерину, 0,5 мМ PMSF, рН 7, 5. Отримані фракції 30 були проаналізовані, застосовуючи SDS-PAGE (Maniatis et al, Molecular Cloning (Молекулярне клонування) Cold Spring Harbor, NY, 1982). Фракції, що містять цільовий протеїн, об'єднували і, якщо протеїн був експресований із застосуванням гістидинової мітки, розщеплювали тромбіном (1U на 4 мг протеїну, 8 годин при 16 °С), щоб видалити полігістидинові мітки. Потім фракції піддавали діалізу проти буфера (500 мМ L-аргініну, 50 мМ Тріс, 2,5 мМ ZnSO_4 , рН 7,4).

Приклад 1. Злитий протеїн SEQ ID NO: 1

40 Протеїн послідовності SEQ ID NO: 1 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 173 амінокислот, і масу 19,8 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL121-281 гептапептид, похідний від VEGF (SEQ ID NO: 17) приєднано в якості ефекторного пептиду. Між ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL інкорпорований гнучкий гліциновий стеричний лінкер SEQ ID NO: 28.

45 Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуєча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli* , є, відповідно, SEQ ID NO: 1 і SEQ ID NO: 31, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 1 структури, описаної вище, була використана в якості шаблону для генерування його кодуєчої ДНК послідовності SEQ ID NO: 31. Була генерована плазміда, яка містить кодуєчу послідовність ДНК у двох варіантах, один з яких забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, а другий – без жодної мітки, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штамів *E. coli* , BL21 (DE3) і Tuner (DE3) pLysS , обидва від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 2. Злитий протеїн SEQ ID NO: 2

60 Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 2 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 199 амінокислот, і масу 22,8 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95-281 гептапептид, похідний від VEGF (SEQ ID NO: 17) приєднано в якості ефекторного пептиду. Між

ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL інкорпорований гнучкий гліциновий стеричний лінкер SEQ ID NO: 28.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 32, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 32. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli*, BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 3. Злитий протеїн SEQ ID NO: 3

Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 3 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 230 амінокислот, і масу 26,3 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL121-281 гептапептид, похідний від VEGF (SEQ ID NO: 17), а на C-кінці послідовності TRAIL121-281 фрагменти I і II тумстатину (SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 19, відповідно), приєднано в якості ефекторного пептиду. Між ефекторним пептидом на N-кінці послідовності TRAIL і послідовністю TRAIL інкорпорований гнучкий гліциновий стеричний лінкер SEQ ID NO: 28. Між ефекторним пептидом, приєднаним на C-кінці послідовності TRAIL і послідовністю TRAIL інкорпорований стеричний лінкер, що складається з 3 гліцинових залишків Gly Gly Gly, і послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних металопротеазою MMP (SEQ. No. 24) і урокіназою uPA (SEQ. No. 25), завдяки чому ефекторний пептид має бути розщепленим у середовищі пухлини.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 3 і SEQ ID NO: 33, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 3 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 33. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, яка дає можливість забезпечити експресію мітки Histag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli*, BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 4. Злитий протеїн SEQ ID NO: 4

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 4 представляє собою злитий протеїн, що має довжину 187 амінокислот і масу 21,4 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL 121-281 приєднано дві послідовності гептапептиду, отриманих з VEGF (SEQ No.17), в якості ефекторного пептиду. Між двома послідовностями ефекторного пептиду включена послідовність сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), за рахунок чого ефекторний пептид піддається розщепленню в пухлинному середовищі. Між послідовність сайту розщеплення MMP і послідовністю ефекторного пептиду включений один залишок глютамінової кислоти Е. Між ефекторним пептидом (SEQ 17) і послідовністю TRAIL інкорпорований гнучкий стеричний гліциновий лінкер (SEQ No.28).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 4 і SEQ ID NO: 34, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 4 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 34. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК у двох варіантах, один з яких забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, а другий – без жодної мітки, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21DE3pLysSRIL від Stratagene і штаму Tuner (DE3) від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 5. Злитий протеїн SEQ ID NO: 5

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 5 являє собою злитий протеїн, що має довжину 187 амінокислот і масу 21,8 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL 121-281 приєднано дві послідовності гептапептиду, отриманих з VEGF (SEQ No.17), в якості ефекторного пептиду. Між двома послідовностями ефекторного пептиду протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), за рахунок чого ефекторний пептид піддається розщепленню в пухлинному середовищі. Між послідовністю сайту розщеплення MMP і послідовністю ефекторного протеїну включений один залишок глютамінової кислоти Е. Крім того, на N-кінці TRAIL приєднані два гліцинові залишки.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 35, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 5 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 35. Була генерована плазмідна, яка містить кодуючу послідовність ДНК у двох варіантах, один з яких забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, а другий – без жодної мітки, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli* Tuner (DE3) від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 6. Злитий протеїн SEQ ID NO: 6

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 6 являє собою злитий протеїн, що має довжину 222 амінокислот і масу 25,3 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95-281 приєднано дві послідовності гептапептиду, отриманих з VEGF (SEQ No.17), в якості ефекторного пептиду. Між двома послідовностями ефекторного пептиду протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 55), за рахунок чого ефекторний пептид піддається розщепленню в пухлинному середовищі. Між ефекторним пептидом (SEQ ID NO: 17) і послідовністю TRAIL інкорпоровано цистеїнів гнучкий стеричний лінкер (SEQ ID NO: 26).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 1, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 6 і SEQ ID NO: 36, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 6 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 36. Була генерована плазмідна, яка містить кодуючу послідовність ДНК без послідовності, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli* Tuner (DE3) від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 7. Злитий протеїн SEQ ID NO: 7

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 7 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 168 амінокислот, і масу 19,4 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL119-281 приєднано в якості ефекторного пептиду послідовність, якою є ліганд CD13 (SEQ ID NO: 20).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 2, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 7 і SEQ ID NO: 37, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 7 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 37. Була генерована плазмідна, яка містить кодуючу послідовність ДНК у двох варіантах, один з яких забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, а другий – без жодної мітки, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli* Tuner (DE3) від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 8. Злитий протеїн SEQ ID NO: 8

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 8 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 201 амінокислот, і масу 23,2 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95 приєднано в якості

ефекторного пептиду послідовність, якою є ліганд CD13 (SEQ ID NO: 21). Між послідовністю TRAIL і послідовністю ефекторного пептиду протеїн містить послідовність гнучкого гліцин-серинового лінкера (SEQ ID NO: 30).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 2, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 38, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 8 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності SEQ ID NO: 38. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli* Tuner (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

15 Приклад 9. Злитий протеїн SEQ ID NO: 9

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 9 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 192 амінокислот, і масу 22,1 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL119-281 приєднано в якості ефекторного пептиду послідовність фрагменту PDGF (SEQ ID NO: 22). Між ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнані урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 2, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 9 і SEQ ID NO: 39, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 9 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 39. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК у двох варіантах, один з яких забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, а другий – без жодної мітки, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штаму *E. coli* Rosetta (DE3) від Novagen. Протеїни розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 10. Злитий протеїн SEQ ID NO: 10

35 Протеїн послідовності SEQ ID NO: 10 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 216 амінокислот, і масу 24,9 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95-281 приєднано в якості ефекторного пептиду послідовність фрагменту PDGF (SEQ ID NO: 22). Між ефекторним пептидом і доменом TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнані урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 2, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 10 і SEQ ID NO: 40, як показано в доданому переліку послідовностей.

45 Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 10 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 40. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штамів *E. coli* BL21 (DE3) і Tuner(DE3)pLysS обидва - від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 11. Злитий протеїн SEQ ID NO: 11

55 Протеїн послідовності SEQ ID NO: 11 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 226 амінокислот, і масу 25,7 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95-281 приєднано в якості ефекторного пептиду послідовність фрагменту PDGF (SEQ ID NO: 22). Між ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнані урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між

послідовністю TRAIL і послідовністю сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP протеїн також містить гнучкий гліцин-цистеїн-аланіновий лінкер (SEQ ID NO: 27).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 2, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 41, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 11 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 41. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК без послідовності, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штамів *E. coli* BL21 (DE3) і Tuner(DE3)pLysS обидва - від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 12. Злитий протеїн SEQ ID NO: 12

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 12 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 217 амінокислот, і масу 25 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL121-281 приєднано в якості ефекторного пептиду фрагменти I і II тумстатину (SEQ ID NO: 18 і SEQ ID NO: 19). Між ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнані урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 24), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між послідовністю TRAIL і послідовністю сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP протеїн також містить гнучкий лінкер, що складається з 3 гліцинових залишків Gly Gly Gly.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 3, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 12 і SEQ ID NO: 41, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 12 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 42. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики А з використанням штамів *E. coli* BL21 (DE3) і Tuner(DE3)pLysS обидва - від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 13. Злитий протеїн SEQ ID NO: 13

Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 13 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 220 амінокислот, і масу 25,1 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL121-281 приєднано в якості ефекторного пептиду фрагмент II тумстатину (SEQ ID NO: 19), а на C-кінці послідовності TRAIL121-281 фрагмент I тумстатину (SEQ ID NO: 18), приєднано в якості ефекторного пептиду. Між ефекторним пептидом послідовністю TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ. No. 24), завдяки чому ефекторний пептид має бути розщепленим у середовищі пухлини. Між послідовністю сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP, і послідовністю TRAIL протеїн містить три гліцинові залишки Gly Gly Gly, а між C-кінцем послідовності TRAIL і фрагментом II тумстатину – гнучкий лінкер, який складається з трьох гліцинових залишків Gly Gly Gly

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 3, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 13 і SEQ ID NO: 43, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 13 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 42. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen і штаму BL21DE3pLysSRIL від Stratagene. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 14. Злитий протеїн SEQ ID NO: 14

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 14 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 181 амінокислоти, і масу 21 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL120-281 приєднано в якості ефекторного пептиду фрагмент EGF (SEQ ID NO: 23). Між ефекторним пептидом і N-кінцем домену TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 56), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 3, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 44, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 14 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 44. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen і штаму BL21DE3pLysSRIL від Stratagene. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 15. Злитий протеїн SEQ ID NO: 15

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 15 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 217 амінокислот, і масу 24,4 кДа, в якому на N-кінці послідовності hTRAIL 95-281 приєднано в якості ефекторного пептиду фрагмент EGF (SEQ ID NO: 23). Між ефекторним пептидом і N-кінцем домену TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 56), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між послідовністю сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP, і послідовністю TRAIL протеїн містить одиночний залишок проліну, за яким слідує гнучкий гліцин-цистеїн-аланіновий лінкер (SEQ ID NO: 26).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 3, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 15 і SEQ ID NO: 44, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 15 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 45. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 16. Злитий протеїн SEQ ID NO: 46

Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 46 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 211 амінокислот, і масу 24,4 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL95-281 два зв'язані один з одним гептапептиди, похідні від VEGF (SEQ ID NO: 17), приєднані в якості ефекторних пептидів. Між ефекторними пептидами протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 55), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі.

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 9, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 46 і SEQ ID NO: 50, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 46 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 50. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 17. Злитий протеїн SEQ ID NO: 47

Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 46 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 200 амінокислот, і масу 22,7 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL120-281 два зв'язані один з одним гептапептиди, похідні від VEGF (SEQ ID NO: 17), приєднані в якості ефекторних пептидів. Між ефекторними пептидами протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 55), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між ефекторним протеїном і доменом TRAIL протеїн містить згодом гнучкий лінкер (SEQ ID NO: 26), який сприяє формуванню триланцюгового полімеру, і гнучкий гліцин-сериновий лінкер (SEQ ID NO: 54).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 9, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 47 і SEQ ID NO: 51, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 47 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 51. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 18. Злитий протеїн SEQ ID NO: 48

Злитий протеїн послідовності SEQ ID NO: 48 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 192 амінокислот, і масу 21,9 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL120-281 два зв'язані один з одним гептапептиди, похідні від VEGF (SEQ ID NO: 17), приєднані в якості ефекторних пептидів. Між ефекторними пептидами протеїн містить послідовність сайту розщеплення, розпізнаного урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між ефекторним протеїном і доменом TRAIL протеїн містить згодом гнучкий лінкер (SEQ ID NO: 26), який сприяє формуванню триланцюгового полімеру, і гнучкий гліцин-сериновий лінкер (SEQ ID NO: 54).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 9, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 48 і SEQ ID NO: 52, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 48 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 52. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК з послідовністю, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до загальної методики В з використанням штаму *E. coli* BL21 (DE3) від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 19. Злитий протеїн SEQ ID NO: 49

Протеїн послідовності SEQ ID NO: 49 являє собою злитий протеїн, що має довжину, складену з 206 амінокислот, і масу 23,3 кДа, в якому на N-кінці послідовності TRAIL120-281 фрагмент PDGF (SEQ ID NO: 22), приєднано в якості ефекторного пептиду. Між ефекторним пептидом і послідовністю TRAIL протеїн містить послідовності сайтів розщеплення, розпізнаних урокіназою uPA (SEQ ID NO: 25) і металопротеазою MMP (SEQ ID NO: 55), завдяки чому ефекторний пептид має піддаватися розщепленню у пухлинному середовищі. Між послідовністю TRAIL і послідовністю сайту розщеплення, розпізнаного металопротеазою MMP, протеїн містить також розташований згодом гнучкий гліцин-цистеїн-аланіновий лінкер (SEQ ID NO: 26), який сприяє формуванню триланцюгового полімеру, і гнучкий гліцин-сериновий лінкер (SEQ ID NO: 54).

Структура злитого протеїну схематично представлена на фіг. 9, а його амінокислотна послідовність і ДНК кодуюча послідовність, що містить кодони, оптимізовані для експресії в *E. coli*, є, відповідно, SEQ ID NO: 49 і SEQ ID NO: 53, як показано в доданому переліку послідовностей.

Амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 49 була використана в якості шаблону для генерування його кодуючої ДНК послідовності ДНК SEQ ID NO: 53. Була генерована плазміда, яка містить кодуючу послідовність ДНК без послідовності, що забезпечує експресію мітки HisTag і сайту, розпізнаного тромбіном, при цьому гіперекспресію злитого протеїну здійснювали відповідно до описаних вище загальних методик. Гіперекспресію проводили відповідно до

загальної методики А з використанням штамів E. coli BL21 (DE3) і Tuner(DE3)pLysS обидва від Novagen. Протеїн розділяли із застосуванням електрофорезу відповідно до загальної методики, описаної вище.

Приклад 20. Дослідження протипухлинної активності злитих протеїнів

5 Дослідження протипухлинної активності злитих протеїнів було проведено *in vitro* при випробуваннях на цитотоксичність на клітинних лініях пухлини та *in vivo* на мишах. Для порівняння були використані протеїн rhTRAIL 114-281 і плацебо.

1. Вимірювання циркулярного дихроїзму – визначення вмісту вторинних структур отриманих протеїнів

10 Якість препаратів злитих протеїнів з точки зору їх структури було визначено методом циркулярного дихроїзму (CD) у прикладах 1, 4, 5, 9 і 14.

15 Циркулярний дихроїзм застосовують для визначення вторинних структур і конформації протеїну. У методі CD використовують оптичну активність протеїнових структур, що проявляється через поворот площини поляризації світла і через виникнення еліптичної поляризації. Спектр CD протеїнів в області дальнього ультрафіолету (UV) надає точні дані про конформацію основного поліпептидного ланцюга.

Діаліз

20 Призначені для досліджень зразки протеїну, після приготування в буферному розчині, що складається з 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 10% гліцерину, 0,1 mM ZnCl₂, 80 mM сахарози, 5 mM DTT, pH 7,4 (або як альтернатива, 5 mM NaH₂PO₄, 95 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, 5 mM глютаміну, 0,1 mM ZnCl₂, 10% гліцерину, 80 mM сахарози, pH 8,0 для протеїнів, підданих гіперекспресії у відповідності з методикою, описаною вище, але без мітки HisTag і очищених на SP Sepharose – з міткою * на результатах, зведених у Таблицю 5) були піддані обробці методом діалізу в пакетах для діалізу (Sigma-Aldrich) з відділенням (відрізанням) 12 кДа. Діаліз проводили з перемішуванням проти 100-кратного надлишку (V/V) буфера, в порівнянні з протеїновими препаратами, протягом декількох годин при температурі 4° С. Після завершення діалізу кожен препарат центрифугували (при 25 000 оборотів за хвилину, протягом 10 хв., при 4° С) і збирали відповідні супернатанти. Концентрацію протеїну в зразках, отриманих таким чином, визначали за методом Бредфорда.

30 Визначення концентрації протеїну із застосуванням методу Бредфорда

В дослідженнях протеїну концентрацію реагенту отримували шляхом розчинення 17,5 мг Coomassie G-250 в суміші етанолу (4,8% об'єм/об'єм), фосфорної кислоти (V) (5,95% об'єм/об'єм) і води. Для визначення концентрації протеїну 1-10 мл зразка додавали до 800 мл реагенту Бредфорда. Еталонний зразок містив реагент Бредфорда і відповідний об'єм буфера, в якому визначали розчинений протеїн. Спектральну поглинальну спроможність зчитували на спектрофотометрі Cary 300 при довжині хвилі 595 нм після принаймні 5 хвилин інкубації зразків при кімнатній температурі. Концентрацію протеїну розраховували за стандартною кривою, одержаною для BSA (бичачого сироваткового альбуміну) в діапазоні 10 концентрацій 1-10 мкг / мл. Вихідні концентрації протеїну оцінювали після урахуванням розбавлення в процесі підготовки зразка для вимірювання.

Вимірювання циркулярного дихроїзму

45 Вимірювання циркулярного дихроїзму для протеїнів в діапазоні концентрацій 0,1-2,7 мг / мл було виконано на Jasco J-710 спектрополяриметрі в кварцовій кюветі з оптичним шляхом 0,2 мм або 1 мм. Вимірювання проводили в потоку азоту при 7 л / хв., що дозволило виконувати вимірювання в діапазоні довжини хвилі від 195 до 250 нм.

Параметри вимірювання: спектральний дозвіл - 1 нм, половина ширини світлового пучка 1 нм, чутливість 20 mdeg (міліградусів повороту), час усереднення для однієї довжини хвилі - 8 с, швидкість сканування - 10нм/хв., усереднення 3 вимірювань.

50 Результати були представлені як середнє значення трьох вимірювань. Спектри циркулярного дихроїзму для rhTRAIL 114-281, rhTRAIL 95-281 і протеїнів, відповідно до Прикладів 1, 4, 5, 9 і 14 представлені на фіг. 4.

Визначення вмісту вторинних структур

55 Отримані спектри були проаналізовані числовими методами в діапазоні 193-250 нм з використанням CDPPro пакета програмного забезпечення. Точки, для яких напруга на фотоумножувачі перевищувала 700 V, були опущені через занадто низьке співвідношення "сигнал – шум" в даному діапазоні довжини хвилі. Отримані дані були використані для розрахунку вмісту окремих вторинних структур в досліджуваних протеїнах з використанням пакету програмного забезпечення CDPPro (Таблиця 1)

Таблиця 1

Вміст вторинних структур у досліджуваних протеїнах

Протеїн	NRMSD (Exp-Cal)	α-спіраль	β- лист	Зміщення	Розлад
Приклад 4	0.319	3.7%	39.4%	20.7%	36.2%
Приклад 1	0.093	7.8%	8.6%	63.1%	20.5%
Приклад 5	0.04	41.3%	15.0%	2.5%	41.2%
Приклад 9	0.112	2.9%	41.0%	20.7%	35.4%
Приклад 14	0.244	0.2%	55.3%	17.1%	27.4%
rhTRAIL*		1.94%	50.97%	7.74%	39.35%
rhTRAIL 114-281	0.389	4.9%	33.7%	23.1%	38.3%

* Значення, отримане на базі кристалічної структури 1D4V

Контрольні зразки (rhTRAIL 114-281) виявляють спектр CD, характерний для протеїнів з переважним типом структур β-лист (різко окреслена еліптичність, мінімум, на довжині хвилі 220 нм). Це підтверджує розрахунок вторинних компонентів структури, який передбачає наявність незначної кількості α-спіраль елементів. Отриманий результат також узгоджується з даними про кристалічну структуру протеїну hTRAIL і є характеристичним для протеїнів, що розкриті у прикладах 4, 9 і 14, відповідно до яких бета-елементи становлять більше 40% їх складу.

Що стосується всіх злитих протеїнів, спектри дихроїзму характеризуються одним мінімумом на довжині хвилі 220 нм.

Невеликі молекули ефекторних пептидів прикріплені до TRAIL в злитих протеїнах, становлять незначну частину протеїну і не обов'язково створюють певну вторинну структуру; проаналізовані протеїни не повинні суттєво відрізнятися від первинного протеїну. Значні відмінності, наприклад, високий вміст альфа-структур у разі протеїну згідно з прикладом. 5, або листи (sheets), такі як ті, що спостерігалися для білків з прикладу 1 dVCTR, сталися, можливо, через обмежений діапазон спектра CD, що було піддано аналізу, особливо в області 180 - 200 нм.

2. Випробовування на клітинних лініях in vitro.

Клітинні лінії

Таблиця 2

Адгезивні клітинні лінії

Клітинна лінія	Вид раку	Середовище	Число клітин на лунку (тисячі)
Colo 205 ATCC #CCL-222	Людський колоректальний рак (рак прямої кишки)	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	5
HT-29 ATCC # CCL-2	Людський колоректальний рак (рак прямої кишки)	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	5
DU-145 ATCC # HTB-81	Людський рак простати	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3
PC-3 ATCC # CRL-1435	Людський рак простати	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4
MCF-7 ATCC #HTB-22	Людський рак молочної залози	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4.5

Таблиця 2

Адгезивні клітинні лінії

Клітинна лінія	Вид раку	Середовище	Число клітин на лунку (тисячі)
MDA-MB-231 ATCC # HTB-26	Людський рак молочної залози	DMEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4.5
UM-UC-3 ATCC # CLR-1749	Людський рак сечового міхура	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3.5
SW780 ATCC #CRL-2169	Людський рак сечового міхура	DMEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3
SW620 ATCC #CCL-227	Людський колоректальний рак (рак прямої кишки)	DMEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	5
BxPC-3 ATCC #CRL-1687	Людський панкреатичний рак (рак підшлункової залози)	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4.5
NIH: OVCAR-3 ATCC #HTB-161	Людський оваріальний рак (рак яєчників)	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 20% FBS (фетальна бичача сироватка) + 0,01мг/мл інсуліну + пеніцилін + стрептоміцин	7
HepG2 ATCC # HB-8065	Людська гепатома печінки	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	7
293 ATCC # CLR-1573	Людські ембріональні ниркові клітини (рак)	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4
ACHN ATCC #CCL-222	Людський нирковий рак	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4
CAKI 2 ATCC # HTB-47	Людський нирковий рак	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3.5
HT144 ATCC # HTB-63	Клітини меланоми людини	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	7
LNCaP ATCC # CRL-1740	Людський рак простати	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4.5
NCI-H69 ATCC# HTB-119	Людський дрібноклітинний рак легені	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	22
Jurkat A3 ATCC#CRL-2570	Людська лейкемія	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	10
MES-SA/Dx5 ATCC# CRL-1977	Рак матки	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4
SK-MES-1 ATCC# HTB-58	Людський рак легені	MEM (клітинна культура)+ 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	4

Таблиця 2

Адгезивні клітинні лінії

Клітинна лінія	Вид раку	Середовище	Число клітин на лунку (тисячі)
A549 ATCC# CCL-185	Людський рак легені	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 20% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	2.5
HCT116 ATCC# CCL-247	Людський колоректальний рак (рак прямої кишки)	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3
MCF10A ATCC# CRL-10317	Епітеліальні клітини молочної залози	DMEM-F12 (1:1) + 5% кінської сироватки + 0,5мкг/мл гідрокортизону + 10мкг/мл інсуліну + 20нг/мл EGF (епідермального фактора росту)	4.5
MES-SA ATCC# CRL-1976	Рак матки	McCoy's (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	3.5
PANC-1 CLS# 300228	Людський панкреатичний рак (рак підшлункової залози)	DMEM (клітинна культура) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	5

Таблиця 3

Неадгезивні клітини:

Клітинна лінія	Вид раку	Середовище	Число клітин на лунку (тисячі)
NCI-H69 ATCC# HTB-119	Людський дрібноклітинний рак легені	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	22
Jurkat A3 ATCC#CRL-2570	Людська лейкемія	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	10
HL60 ATCC# CCL-240	Людська лейкемія	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 20% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	10
CCRF-CEM ATCC# CCL-119	Людська лейкемія	RPMI (середовище для культур клітин і тканин) + 10% FBS (фетальна бичача сироватка) + пеніцилін + стрептоміцин	10

Тест на цитотоксичність МТТ

- МТТ є колориметричним аналізом, застосовуваним для вимірювання клітинної проліферації, життєздатності і цитотоксичності. Він полягає в розкладанні жовтої солі тетразолію МТТ (4,5-диметил-2-тіазоліл) -2,5-дифенілтетразолію броміду) до нерозчинного у воді фіолетового барвника формазану за допомогою мітохондріального ферменту сукцинат-тетразолію редуктази 1. Скорочення МТТ відбувається тільки в живих клітинах. Аналіз даних полягає у визначенні IC_{50} концентрації протеїну (в нг / мл), при якому 50% скорочення числа клітин відбувається в обробленій популяції, у порівнянні з контрольними клітинами. Результати були досліджені з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 5.0. Випробування проводилися відповідно до описів з літератури (Celis, JE, (1998). Cell Biology, a Laboratory Handbook (Клітинна біологія, лабораторний довідник), second edition, Academic Press, San Diego; Yang, Y., Koh, LW, Tsai, JH., (2004); Involvement of viral and chemical factors with oral

cancer in Taiwan (Дослідження впливу вірусних і хімічних факторів на злоякісні новоутворення порожнини рота в Тайвані), Jpn J Clin Oncol, 34 (4), 176-183). Середовище клітинної культури розбавляли до певної щільності (10^4 - 10^5 клітин на 100 мкл). Потім 100 мкл належним чином розведеної клітинної суспензії поміщали в 96-лунковий планшет у трьох повторях. Підготовлені таким чином клітини інкубували протягом 24 год. при 37 °C у 5% або 10% CO₂, залежно від використаного середовища, а далі до клітин (в 100 мкл середовища) було додано ще 100 мкл середовища, що мало різні концентрації досліджуваних протеїнів. Після інкубації клітин з досліджуваними протеїнами протягом найближчих 72 годин, що еквівалентно 3-4 разовому поділу клітин, до середовища з досліджуваним протеїном додавали 20 мл робочого розчину MTT [5 мг / мл] і інкубували протягом 3 г од при температурі 37° C в 5% CO₂. Після цього середовище з розчином MTT видаляли, і кристали формазану розчиняли шляхом додавання 100 мкл ДМСО (DMSO). Після перемішування вимірювали спектральну поглинальну спроможність при 570 нм (референс - фільтр 690 нм).

Тест на цитотоксичність EZ4U

Тест EZ4U (Біомедіка) був застосований для тестування цитотоксичної активності протеїнів у неадгезивних клітинних лініях. Зазначений тест є модифікацією MTT, в якому формазан, сформований при відновленні солі тетразолію, є водорозчинним. Дослідження життєздатності клітин проводили після безперервної 72-годинної інкубації клітин з протеїном (сім концентрацій протеїну, кожен у трьох повторях). На цій основі були визначені значення IC₅₀ (як середня величина, виведена з показників результатів двох незалежних експериментів), застосовуючи програмне забезпечення GraphPad Prism 5.

Результати досліджень цитотоксичності *in vitro* наведені в таблиці 4 і Таблиці 5 як значення IC₅₀ (нг / мл), що є відповідними концентрації протеїну, при якій цитотоксичний ефект злитих протеїнів спостерігається на рівні 50% по відношенню до контрольних клітин, оброблених тільки розчинником.

В Таблиці 4 показано, що протеїни, які були спочатку експресовані з міткою гістидину, який згодом був видалений, позначалися як а) у прикладі №... Протеїни, які були спочатку експресовані без мітки гістидину, позначалися як b) у прикладі №...

Кожен експеримент демонструє середнє значення показників результатів, щонайменше, двох незалежних експериментів, проведених у трьох повторях. Як критерій відсутності активності протеїнових препаратів була прийнята межа IC₅₀, відповідна 2000 нг / мл. Злиті протеїни зі значенням IC₅₀ вище 2000 вважаються неактивними.

Клітини для даного дослідження були обрані таким чином, щоб включити пухлинні клітинні лінії з природного резистентності до протеїну TRAIL (критерій природної резистентності до TRAIL: IC₅₀ для протеїну TRAIL > 2000), пухлинні клітинні лінії, чутливі до протеїну TRAIL і резистентні до доксорубіцинової лінії MES- SA/DX5 як ракової лінії, резистентної до звичайних протиракових лікарських засобів.

Недиференційована клітинна лінія HUVEC була використана в якості здорової контрольної клітинної лінії для оцінки впливу / токсичності злитих протеїнів у середовищі неракових клітин.

Отримані результати підтверджують можливість подолання резистентності клітинних ліній щодо TRAIL шляхом введення певних злитих протеїнів за винаходом в клітини з природною стійкістю до TRAIL. При введенні злитих протеїнів за винаходом в клітини, чутливі до TRAIL, в деяких випадках дійсно спостерігалось чітке і сильне потенціювання дієвості, проявляючись в зниженні значень IC₅₀ для злитого протеїну, порівняно з IC₅₀ тільки для TRAIL. Крім того, була отримана цитотоксична активність злитого протеїну за винаходом в клітинах, резистентних до класичного протиракового лікарського засобу доксорубіцину, і в деяких випадках вона виявилася сильнішою, ніж активність тільки TRAIL.

Значення IC₅₀ вище 2000, отримані для неракових клітинних ліній, показують відсутність токсичних ефектів, пов'язаних з використанням протеїнів за даним винаходом, відносно здорових клітин, що вказує на потенціал низької системної токсичності протеїну.

Визначення цитотоксичної активності вибраних протеїнових препаратів проти розширеної панелі пухлинних клітинних ліній.

У таблиці 5 представлені результати цитотоксичної активності *in vitro* для вибраних злитих протеїнів за даним винаходом проти широкої панелі пухлинних клітин різних органів, відповідних широкому спектру найпоширеніших видів раку.

В Таблиці 4 протеїни, які були спочатку експресовані з міткою гістидину, який згодом був видалений, позначалися як а) у прикладі №... Протеїни, які були спочатку експресовані без мітки гістидину, позначалися як b) у прикладі №...

Отримані значення IC₅₀ підтверджують високу цитотоксичну активність злитих протеїнів, а отже, їх потенційну корисність в лікуванні раку.

Таблиця 4

Цитотоксична активність злитих протеїнів за винаходом

Протеїн	Непереривна інкубація препаратів з клітинами протягом 72годин (тест МТТ, нг/мл)											
	MES-SA		MES-SA/Dx5		HCT116		SK-MES-1		A549		MCF10A	
	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD	IC ₅₀	±SD
rhTRAIL 114-281	>2000		32.2	2.40	173	31.3	12.2	2.33	>2000		>2000	
Прикл. 9 ^{a)}	3.96	1.44	3.250	0.95	3.95	9.95	3.00	2.34	131.10	43.98	1420.5	451.22
Прикл. 14 ^{a)}	2000		1738.1	1.47	632.05	26.94	81.27	13.41	2000		2000	
Прикл. 7 ^{a)}	2000		6.822	2.83	38.66	11.34	5.80	1.93	2000		2000	
Прикл. 1 ^{a)}	7.96	0.72	0.743	0.15	25.23	21.98	0.64	0.12	513.10	38.33	131.90	77.92
Прикл. 4 ^{a)}	4.79	0.78	3.69	1.05	14.27	2.48	0.43	0.15	705.15	40.38	>2000	
Прикл. 5 ^{a)}	1.03	0.08	0.699	0.06	2.48	2.03	0.54	0.34	9.95	0.88	13.01	2.17
Прикл. 13 ^{a)}	83.03	21,.74	34.000	3.54	162.00	95.88	22.08	1.43	979.75	1.91	834.05	38.11

SD – стандартна погрішність

Таблиця 5

Аналіз цитотоксичної активності окремих вибраних протеїнових препаратів проти розширеної панелі пухлинних клітинних ліній

Клітинна лінія	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	24.90	17.68	10000		10000		10000		10000		10000		2052.0 0	466.0	10000	
Пр. 14 ^{a)}	3.19	1.68	10000		10000		8839	1642.6 0	10000		8928.0 0	543.0 6	792.70	96.66	10000	
Клітинна лінія	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	120.00	42.43	2242	1367	10000		10000		10000		93.10	8.34	10000		10000	
Пр. 14 ^{a)}	93.13	33.76	30.37	3.10	8538	2068	10000		10000		190.80	143.1 7	10000		10000	
Клітинна лінія	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	5889	111.0	64.71	31.81	10000		1734	218.5	10000		10000		10000		10000	
Пр. 14 ^{a)}	186.80	76.72	79.60	18.81	6153	808.2 2	1130	26.16	10000		10000		10000		10000	
Клітинна лінія	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	24.90	17.68	10000		10000		10000		10000		10000		2052.0 0	466.0	10000	
Пр. 1 ^{a)}	0.87	0.19	852.60	1.06	3650	128.7 0	832	329.20	23.83	0.54	64.33	22.31	254.00	4.24	980.60	
Клітинна лінія	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	120.00	42.43	2242	1367	10000		10000		10000		93.10	8.34	10000		10000	
Пр. 1 ^{a)}	3.78	0.22	7.03	0.13	84350	3.80	230.50	61.50	2116	379	5.58	2.94	1530	137	1436	
Клітинна лінія	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	5889	111.0	64.71	31.81	10000		1734	218.5	10000		10000		10000		10000	
Пр. 1 ^{a)}	7.71	0.09	2.57	0.43	633	89.73	4.47	1.11	71.19	8.92	5.09	2.40	1339		1357	
Клітинна лінія	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	24.90	17.68	10000		10000		10000		10000		10000		2052	466.0	10000	
Пр. 5 ^{a)}	12.24	3.65	1600		1600		684.50	17.00	345	11.17	473	63.64	1600		1056	
Клітинна лінія	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD

Продовження таблиці 5

Аналіз цитотоксичної активності окремих вибраних протеїнових препаратів проти розширеної панелі пухлинних клітинних ліній

rhTRAIL 95-281	120.00	42.43	2242	1367	10000		10000		10000		93.10	8.34	10000		10000	
Пр. 5 ^{a)}	38.46	1.03	134.80	9.55	1600		1303	2.10	1600		79.25	27.93	1600		1600	
Клітинна лінія	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	5889	111.0	64.71	31.81	10000		1734	218.5	10000		10000		10000		10000	
Пр. 5 ^{a)}	118.90	28.14	93.90	1.41	1315	389.6 ₂	57.44	1.89	510.00	76.37	30.15	4.00	1600		1600	
Клітинна лінія	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	24.90	17.68	10000		10000		10000		10000		10000		2052	466.0	10000	
Пр. 9 ^{a)}	0.013	0.01	264.20	46.95	47.86	12,50	1025	190.10	1.276	0.40	15.77	9.81	32.90	27.01	463.90	
Клітинна лінія	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	120.00	42.43	2242	1367	10000		10000		10000		93.10	8.34	10000		10000	
Пр. 9 ^{a)}	1.006		0.136	0.07	181.60	44.50	24.42	0.10	2500		0.456	0.64	818.60	130.6 ₇	2500	
Клітинна лінія	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	5889	111.0	64.71	31.81	10000		1734	218.5	10000		10000		10000		10000	
Пр. 9 ^{a)}	0.004	0.01	0.001		9.78	1.31	0.845	1.20	4.46	1.98	0.615	1.00	2500		2500	
Клітинна лінія	COLO 205		HT 29		SW 620		MCF 7		MDA-MB-231		DU 145		LNCaP		PC 3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	24.90	17.68	10000		10000		10000		10000		10000		2052.0 ₀	466.0	10000	
Пр. 7 ^{a)}	3.04	0.32	8500		8500		8500		58.00	2.12	4062	1109	3250	766.5 ₀	8500	
Клітинна лінія	SW 780		UM-UC-3		293		CAKI 2		SK-OV-3		OV-CAR-3		H69AR		NCI-H69	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	120.00	42.43	2242	1367	10000		10000		10000		93.10	8.34	10000		10000	
Пр. 7 ^{a)}	7.01	2.58	7.63	0.51	6767	2188	8500		8500		15.14	2.62	8500		8500	
Клітинна лінія	NCI-H460		BxPC3		HepG2		HT 144		ACHN		JURKAT A3		HL60		CCRF-CEM	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	5889	111.0	64.71	31.81	10000		1734	218.5	10000		10000		10000		10000	
Пр. 7 ^{a)}	7.11	1.52	7.94	3.19	8500		92.05	40.52	8500		8500		8500		8500	
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1							
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD						
rhTRAIL 95-281	>1000 ₀		7557	3454	>10000		29.15	12.66	39.35	8.13						
Пр. 9 ^{b)}	391.00	52.33	3.44		1169		<0.001		3.58	0.81						
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		NCI-H460			
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		
rhTRAIL 95-281	>1000 ₀		7557	3454	>10000		29.15	12.66	29.15	12.66	39.35	8.13	5889	111		
Пр. 16 ^{a)}	224.84	268.2 ₆	2473	500	99.27	51.24	0.36	0.25	0.007	0.00	5		22.76			
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29		NCI-H460	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>1000 ₀		7557	3454	>10000		29.15	12.66	29.15	12.66	39.35	8.13	>10000		5889	111
Пр. 6 ^{a)}	422.70		0.014		129.90		0.01		0.0068	0.004 ₃	1.41		69.19	18.79	0.02	
Клітинна лінія	PANC1		PLC/PRF/5		Colo 205		HepG2		BxPc3		SW 620					
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD				
rhTRAIL 95-281	>1000 ₀		>9000		24.90	17.68	>1000 ₀		64.71	31.81	>10000					
Пр. 6 ^{a)}	2.15	0.79	2.35		0.003		0.062		0.014		398.80	80.89				
Клітинна лінія	A549		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		PANC1		293		UM-UC-3			
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD		

Продовження таблиці 5

Аналіз цитотоксичної активності окремих вибраних протеїнових препаратів проти розширеної панелі пухлинних клітинних ліній

rhTRAIL 95-281	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13	>10000		>10000		2242	1367		
Пр. 1 ^{b)}	346.75	102.18	147.80	3.96	4.677	2.23	3.29	1.07	12.38	4.20	84.50	3.82	7.03	0.13		
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29		NCI-H460	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13	>10000		5889	111
Пр. 11 ^{a)}	106.66	41.49	11.50	3.42	95.44		5.28	3.50	0.445	0.30	4.99		911.50	282.14	9.34	5.27
Клітинна лінія	PANC1		PLC/PRF/5													
	mean	SD	mean	SD												
rhTRAIL 95-281	>10000		>9000													
Пр. 11 ^{a)}	3.07		<0.001													
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		NCI-H460		Colo 205	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13	5889	111	24.90	17.68
Пр. 19 ^{a)}	4.31		<0.001		0.19		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		0.004	
Клітинна лінія	HepG2		BxPc3				HCT116		MCF10A		MES-SA/Dx5		SK-MES-1			
	mean	SD	mean	SD			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		64.71	31.81			rhTRAIL 95-281		7557	3454	>10000		29.15	12.66	39.35	8.13
Пр. 19 ^{a)}	0.20		0.013				Пр. 2 ^{a)}		58.86		306.05	7.00	3.492	0.07	9.13	1.31
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		SK-MES-1				HCT116		BxPc3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		39.35	8.13	rhTRAIL 95-281		7557	3454	64.71	31.81
Пр. 13 ^{a)}	979.75	1.91	162.00	12.45	834.05	38.11	83.03	21.74	22.08	1.43	Пр. 14 ^{a)}		275.10	67.46	79.6	18.81
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1					
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD				
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13				
Пр. 17 ^{a)}	233.90		30.33		174.10		7.4		1.589		2.9					
Клітинна лінія	A549		HCT116		MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1					
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD				
rhTRAIL 95-281	>10000		7557	3454	>10000		>10000		29.15	12.66	39.35	8.13				
Пр. 18 ^{a)}	34.28	15.04	11.67	2.39	19.29	4.33	1.24	0.97	0.264	0.35	0.615					
Клітинна лінія	HCT116		MES-SA		SK-MES-1		HT29		NCI-H460		PANC1		PLC/PRF/5		Colo 205	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	7557	3454	>10000		39.35	8.13	>10000		5889	111	>10000		>9000		24.90	17.68
Пр. 5 ^{b)}	0.036	0.01	0.005	0.007	0.004	0.005	783.50	34.65	0.25	0.25	1.05	0.56	5.54		12.24	3.65
Клітинна лінія	HepG2		BxPc3		ACHN		OV-CAR-3				Клітинна лінія		DU 145		OV-CAR-3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		64.71	31.81	>10000		963.00	144.25			rhTRAIL 95-281		>10000		963	144.25
Пр. 5 ^{b)}	9.27		0.36	0.44	0.5	0.09	<0.001	0.001			Пр. 7 ^{a)}		4061	1109	15.14	2.62
Клітинна лінія	HCT116		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		NCI-H460		Colo 205		BxPc3		SW 780		UM-UC-3	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	7557	3454	29.15	12.66	39.35	8.13	5889	111	24.90	17.68	64.71	31.81	120	42.43	2242	1367
Пр. 7 ^{b)}	7.99	1.20	6.822	2.83	5.80	1.93	7.11	1.52	3.04	0.32	7.93	3.19	7.01	2.58	7.63	0.51
Клітинна лінія	MCF10A		MES-SA		MES-SA/Dx5		SK-MES-1		HT29		NCI-H460		PANC1		PLC/PRF/5	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		>10000		29.15	12.66	39.3	8.1	>10000		5889	111	>10000		>9000	
Пр. 9 ^{b)}	10.30	4.15	<0.001		0.008		0.02		264.2	46.9	0.87	0.01	0.025	0.035	21.87	3.58
Клітинна лінія	ACHN		SW 780		UM-UC-3		Клітинна лінія		PANC1		PLC/PRF/5		NCI-H460		PANC1	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rhTRAIL 95-281	>10000		120	42.43	2242	1367	rhTRAIL 95-281		>10000		>9000		5889	111	>10000	

Аналіз цитотоксичної активності окремих вибраних протеїнових препаратів проти розширеної панелі пухлинних клітинних ліній

Пр. 9 ^{b)}	4.46	1.98	<0.001		0.14	0.07	Пр. 15 ^{a)} ETR2.0	128.00		3722		15.20		128	
Клітинна лінія	HCT116	MES-SA	MES-SA/Dx5	SK-MES-1	PC 3							Клітинна лінія	UM-UC-3		
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	
rhTRAIL 95-281	7557	3454	>10000		29.15	12.66	39.3	8.13	>10000				rhTRAIL 95-281	2242	1367
Пр. 4 ^{b)}	14.27	2.48	4.79	0.78	3.69	1.05	0.43	0.15	1056	180.9			Пр. 14 ^{a)} ETR1.0	30.37	3.10

SD – стандартна погрішність; mean – середнє значення

3. Протипухлинна ефективність злитих протеїнів in vivo на ксенотрансплантатах

Протипухлинну активність протеїнових препаратів досліджували на клітинах мишачої моделі раку товстої кишки людини HCT116, Colo205 та SW620, на клітинах людського недрібноклітинного раку легені A549 і NCI-H460-Luc2, клітинах людські гепатоми PLC/PRF/5 (CLS), клітинах людського раку підшлункової залози PANC-1, клітинах людського раку печінки HepG2, клітинах людської крупноклітинної карциноми легенів NCI-H460, клітинах раку матки людини MES-SA/Dx5 множинної лікарської стійкості.

Клітини

Клітини HCT116 і A549 (ATCC CCL-185) витримували в середовищі RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT, USA), змішували у співвідношенні 1:1 з Opti-MEM (Інвітроген, Cat.22600-134) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 2 мМ глютаміну. У день щеплення мишей, клітини були відокремлені від підкладки шляхом промивання клітин трипсином (Інвітроген), потім клітини центрифугували при 1300 оборотах за хвилину, 4° С, протягом 8 хв., суспендували в буфері HBSS (у середовищі Хенкс (Hanks medium), підраховували і розбавляли до концентрації 25 × 10⁶ клітин / мл.

Клітини PLC/PRF/5 (CLS), SW620 і PANC-1 витримували в середовищі DMEM (HyClone, Logan, UT, USA) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 2 мМ глютаміну. У день щеплення мишей, клітини були відокремлені від підкладки шляхом промивання клітин трипсином (Інвітроген), потім клітини центрифугували при 1300 оборотах на хвилину, 4° С, протягом 8 хв., суспендували в буфері HBSS (у середовищі Хенкс (Hanks medium), підраховували і розбавляли до концентрації 25 × 10⁶ клітин / мл.

Клітини HepG2 витримували в середовищі MEM (HyClone, Logan, UT, USA) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 2 мМ глютаміну. У день щеплення мишей, клітини були відокремлені від підкладки шляхом промивання клітин трипсином (Інвітроген), потім клітини центрифугували при 1300 оборотах на хвилину, 4° С, протягом 8 хв., суспендували в буфері HBSS (у середовищі Хенкс (Hanks medium), підраховували і розбавляли до концентрації 25 × 10⁶ клітин / мл.

NCI-H460-Luc2, NCI-H460 і Colo205 витримували в середовищі RPMI1640 (HyClone, Logan, UT, USA) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 2 мМ глютаміну. У день щеплення мишей, клітини були відокремлені від підкладки шляхом промивання клітин трипсином (Інвітроген), потім клітини центрифугували при 1300 оборотах на хвилину, 4° С, протягом 8 хв., суспендували в буфері HBSS (у середовищі Хенкс (Hanks medium), підраховували і розбавляли до концентрації 25 × 10⁶ клітин / мл.

Клітини MES-SA/Dx5 витримували в середовищі McCoy's (HyClone, Logan, UT, USA) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки і 2 мМ глютаміну. У день щеплення мишей, клітини були відокремлені від підкладки шляхом промивання клітин трипсином (Інвітроген), потім клітини центрифугували при 1300 оборотах на хвилину, 4° С, протягом 8 хв., суспендували в буфері HBSS (у середовищі Хенкс (Hanks medium), підраховували і розбавляли до концентрації 25 × 10⁶ клітин / мл.

Миші

Вивчення протипухлинної активності протеїнів за винаходом було проведено 4-5 тижневих або на 7-9 тижневих мишах CD-nude (позбавлених волоссяного покриву) (CrI: CD1-Foxn1^{nu} 1) або на 4-5 тижневих мишах CrI: SHO-Prkdc^{scid} H^{hr}, отриманих від Charles River, Німеччина, або на 4-5 тижневих мишах Cby.Cg-foxn1(nu)/J, отриманих від Centrum Medycyny Doświadczalnej у місті Беласток, Білорусь.

Мишей витримували в специфічних непатогенних умовах з вільним доступом до їжі та демінералізованої води (ad libitum-досхочу). Всі експерименти на тваринах були проведені відповідно до правил керівних матеріалів: "Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Use of Animals in Research, Marketing and Education" ("Міждисциплінарні принципи і правила використання тварин в області наукових досліджень, маркетингу та освіти", виданих New York Academy of Sciences 'Ad Hoc Committee on Animal Research (Нью-Йоркською академією наук, Спеціальним комітетом з експериментальних досліджень тварин) і схвалених IV Local Ethics Committee on Animal Experimentation in Warsaw (No. 71/2009) (IV Місцевим комітетом з етики експериментів на тваринах у Варшаві).

Хід і оцінка експериментів

Розмір пухлини вимірювали за допомогою електронного вимірювального інструмента (кронциркуля), обсяг пухлини розраховували за формулою: $(a^2 \times b)/2$, де a = менша діагональ пухлини (мм), a b = більша діагональ пухлини (мм). Гальмування росту пухлини розраховували за формулою:

$TGI [\%] (\text{інгібування росту пухлини}) = (WT/WC) \times 100 - 100 \%$

де WT відноситься до середнього обсягу пухлини в групі лікування;

WC відноситься до середнього обсягу пухлини в контрольній групі.

Результати експерименту представлені у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення (SD). Всі розрахунки і графіки були отримані з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 5.0.

Модель людського раку товстої кишки

Миші Crl: CD1-Foxn1^{nu} 1

У день 0 миші Crl: CD1-Foxn1^{nu} 1 були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин HCT116, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 \times 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру $\sim 60-90 \text{ мм}^3$ (день 14), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі $\sim 70 \text{ мм}^3$ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 1 (10мг/кг), прикладом 4 (10мг/кг), прикладом 5 (10мг/кг), і прикладом 9 (10мг/кг), і rhTRAIL 114-281 (10мг/кг) - для порівняння. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру $\sim 1000 \text{ мм}^3$, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експериментів, отримані на мишах Crl: CD1-Foxn1^{nu}, хворих на рак товстої кишки HCT116, яких лікували злитими протеїнами за даним винаходом у відповідності з прикладами 1, 4, 5 і 9 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 5 у вигляді графіка зміни обсягу пухлини, а також на фіг. 6, яка показує процес інгібування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг.5 і 6, показують, що введення злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладами 1, 4, 5 і 9 спричинювало інгібування росту пухлини HCT116 при TGI, відповідно 67,8; 69,8; 84,4 і 66,2 % порівняно з контрольним показником на 27-й день експерименту. Відносно rhTRAIL 114-281, застосовуваного як порівняльне посилення, було отримано незначного інгібуючого впливу на ріст пухлинних клітин, в порівнянні з контрольним показником, з TGI на рівні 44 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного ефекту у порівнянні з ефектом, який надається одним rhTRAIL 114-281

Миші Crl:CD1-Foxn1^{nu}

Модель HT116

У день 0 миші Crl: CD1-Foxn1^{nu} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин HCT116, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 \times 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру $\sim 50-78 \text{ мм}^3$ (день 8), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі $\sim 63 \text{ мм}^3$ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 5 (10мг/кг), прикладом 4 (10мг/кг), прикладом 9 (10мг/кг) і прикладом 1 (10мг/кг), і rhTRAIL 114-281 (10мг/кг) - для порівняння з буфером (50 mM Trizma Base (основа Trizma), 150 mM NaCl, 80 mM сахарози, 250 mM L-аргініну, 1 mM глутатіону, Zn^{2+} 0,1 mM, pH 7,3) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) щодня протягом п'яти днів, за якими (після двох днів перерви) слідував ще один п'ятиденний цикл введення препарату. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру $\sim 1000 \text{ мм}^3$, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl: CD1-Foxn1^{nu}, які страждали на рак товстої кишки HCT116, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 5, прикладом 4, прикладом 9 і прикладом 1 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 10 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 11, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 10 і 11, показують, що введення злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладами 5, 4, 9 і 1 призводить до гальмування росту пухлини HCT116, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 80 %, 79 %, 66 % і 68 %, в порівнянні з контрольною групою, на 27-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 44,3 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

Модель HT116

У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин HCT116, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~ 380-430 мм³ (день 14), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 400 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30мг/кг), прикладом 11 (45 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів, кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак товстої кишки HCT116, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30 мг/кг), прикладом 11 (45 мг/кг) і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 12 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 13, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 12 і 13, показують, що введення злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладами 6 і 11 призводить до гальмування росту пухлини HCT116, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 42 %, і 44,5 %, в порівнянні з контрольною групою, на 32-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 5,6 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

Модель COLO205

У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин Colo205, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~90-130 мм³ (день 13), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 115 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30мг/кг), прикладом 19 (30 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (30мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів, кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак товстої кишки Colo205, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30 мг/кг), прикладом 19 (45 мг/кг) і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 14 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 15, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 14 і 15, показують, що введення злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладами 6 і 19 призводить до гальмування росту пухлини Colo205, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 100 %, і 100 %, в порівнянні з

контрольною групою, на 33-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 18,8 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

Модель SW620

У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин SW620, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~290-350 мм³ (день 17), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 320 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30мг/кг), прикладом 11 (40 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (30мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів, кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак товстої кишки SW620, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 6 і прикладом 11 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 16 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 17, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 16 і 17, показують, що введення злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладами 6 і 11 призводить до гальмування росту пухлини SW620, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 62 %, і 23 %, в порівнянні з контрольною групою, на 31-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні -9 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Тестовані злиті протеїни не викликали значних побічних ефектів, що проявляються у зниженні маси тіла мишей (тобто менше 10 % від маси вихідного рівня). Це свідчить про низьку системну токсичність білка.

Модель раку легені людини

Миші Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1

У день 0 миші Crl:CD1-Foxn1^{nu} 1 були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин A549, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~80-100 мм³ (день 14), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 90 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 1 (10мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (10мг/кг) - для порівняння. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) кожного другого дня протягом дванадцяти днів. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:CD1-Foxn1^{nu}, які страждали на рак легені A549, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 1 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 7 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 8, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 7 і 8, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 1 призводить до гальмування росту пухлини A549, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 44,8 %, в порівнянні з контрольною групою, на 33-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 16,5 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші Cby.Cg-foxn1(nu)/J

У день 0 миші Cby.Cg-foxn1(nu)/J були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин A549, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~60-90 мм³ (день 19), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 75 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 1 (15мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з водою для ін'єкції у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Cby.Cg-foxn1(nu)/J, які страждали на рак легені A549, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 1 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 18 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 19, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 18 і 19, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 1 призводить до гальмування росту пухлини A549, з TGI (індексом росту пухлини) відповідно 44,8 %, в порівнянні з контрольною групою, на 33-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 16,6 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші: Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

А. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин NCI-H460, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~150-170 мм³ (день 13), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 160 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 VCTR4,0 (30мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (30мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, рН 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак легені NCI-H460, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 6 VCTR4,0 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 20 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 21, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 20 і 21, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 6 VCTR4,0 призводить до гальмування росту пухлини NCI-H460, з TGI (індексом росту пухлини) 88,5 %, в порівнянні з контрольною групою, на 28-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 17,5 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

В. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 7×10^6 клітин A549, суспендованих в 0,2мл HBSS:Matrigel у відношенні 3:1 за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~140-165 мм³ (день 19), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 150 мм³ і розподілені по групах для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 5 (60мг/кг), прикладом 6 (50 мг/кг), прикладом 11 (50 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 100 % L-аргініну, 80 мМ сахарози, рН 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли за допомогою руйнування спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак легені A549, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 5, прикладом 6, прикладом 11 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 22 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 23, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 22 і 23, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 5, прикладом 6 і прикладом 11 призводить до гальмування росту пухлини A549, з TGI (індексом росту пухлини), відповідно, 39,3 %, 39,3 % і 28 %, у порівнянні з контрольною групою, на 38-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 5,3 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

С. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 7×10^6 клітин NCI-H460-Luc2, суспендованих в 0,1мл HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~100-120 мм³ (день 19), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 110 мм³ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 5 (перше введення - 40мг/кг, за яким слідували 30 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (19 mM NaH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 5 mM глютаміну, 0,1 mM ZnCl₂, 10 % гліцерину, pH 7,4) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак легені NCI-H460-Luc2, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 5 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 24 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 25, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 24 і 25, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 5 призводить до гальмування росту пухлини NCI-H460-Luc2, з TGI (індексом росту пухлини) 97,2 %, у порівнянні з контрольною групою, на 29-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 76 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Д. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 7×10^6 клітин A549, суспендованих в 0,1мл HBSS: Matrigel за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~100-120 мм³ (день 17), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 110 мм³ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 5 (50мг/кг), прикладом 1 (50мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (19 mM NaH₂PO₄, 81 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 5 mM глютаміну, 0,1 mM ZnCl₂, 10 % гліцерину, pH 7,4) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак легені A549, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 5, прикладом 1 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 26 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 27, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 26 і 27, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 5 і прикладом 1 призводить до гальмування росту пухлини A549, з TGI (індексом росту пухлини), відповідно, 52,5 % і 41, 6 % у порівнянні з контрольною групою, на 34-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 21,8 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Модель раку печінки

Миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

А. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин PLC/PRF/5, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~190-220 мм³ (день 31), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 200 мм³ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 (40 мг/кг) і прикладом 11 (50 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (30мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) за наступною схемою: 4 введення кожного третього дня і 2 введення кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак печінки PLC/PRF/5, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 6, прикладом 11 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 28 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 29, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 28 і 29, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 6 і прикладом 11 призводить до гальмування росту пухлини PLC/PRF/5, з TGI (індексом росту пухлини), відповідно, 70,6 % і 63,8 % у порівнянні з контрольною групою, на 49-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні -18 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

А. У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 5×10^6 клітин HepG2, суспендованих в 0,2 мл буферного розчину HBSS за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~190-220 мм³ (день 31), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 200 мм³ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 6 (30 мг/кг) і прикладом 19 (30 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (30мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ Na₂HPO₄, 200 мМ NaCl, 5 мМ глутатіону, 0,1 мМ ZnCl₂, 10 % гліцерину, 80 мМ сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру ~ 1000 мм³, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак печінки HepG2, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 6, прикладом 19 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 30 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 31, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 30 і 31, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 6 і прикладом 19 призводить до гальмування росту пухлини HepG2, з TGI (індексом росту пухлини), відповідно, 82,6 % і 43 % у порівнянні з контрольною групою, на 33-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 12,6 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Модель раку підшлункової залози

У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}

були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 7×10^6 клітин PANC1, суспендованих в 0,1 мл буферного розчину HBSS: Matrigel суміші 3:1 за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру ~87-110 мм³ (день 27), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі ~ 95 мм³ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з прикладом 11 (50 мг/кг) і прикладом 19 (30 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (5 мМ NaH₂PO₄, 95 мМ

Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 5 mM глутатіону, 0,1 mM ZnCl_2 , 100 % L - аргініну, 80 mM сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру $\sim 1000 \text{ мм}^3$, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

5 Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на рак підшлункової залози PANC1, що був пролікований злитим протеїном за винаходом у відповідності з прикладом 11, і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 32 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 33, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

10 Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 32 і 33, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 11 призводить до гальмування росту пухлини PANC1, з TGI (індексом росту пухлини) 43 %, у порівнянні з контрольною групою, на 40-й день експерименту. У випадку з rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з 15 контрольною групою, при TGI на рівні 12,0 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

Модель людської саркоми матки множинної лікарської стійкості

У день 0 миші Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr} були щеплені підшкірно (sc) з правого боку із застосуванням 7×10^6 клітин MES-SA/Dx5, суспендованих в 0,1 мл буферного розчину HBSS: 20 Matrigel суміші 10:1 за допомогою шприца з голкою 0,5 × 25 мм (Bogmark). Коли пухлина досягла розміру $\sim 167\text{-}190 \text{ мм}^3$ (день 19), миші були рандомізовані для отримання середнього розміру пухлин у групі $\sim 180 \text{ мм}^3$ і розподілені по групам для проведення лікування. Лікувальним групам вводили препарати злитих протеїнів за винаходом у відповідності з 25 прикладом 6, прикладом 19 (30 мг/кг) і rhTRAIL 114-281 (20мг/кг) - для порівняння з буфером (5 mM NaH_2PO_4 , 95 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 5 mM глутатіону, 0,1 mM ZnCl_2 , 10 % гліцерину, 80 mM сахарози, pH 8.0) у якості контролю. Препарати вводили внутрішньовенно (iv) шість разів кожного другого дня. Коли в лікувальній групі пухлина досягла середнього розміру $\sim 1000 \text{ мм}^3$, мишей умертвляли руйнуванням спинного мозку. Контрольна група отримувала rhTRAIL 114-281.

30 Результати експерименту на мишах Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}, які страждали на саркому матки множинної лікарської стійкості MES-SA/Dx5, що був пролікований злитими протеїнами за винаходом у відповідності з прикладом 18, прикладом 6, прикладом 19 і для порівняння - rhTRAIL 114-281, показані на фіг. 34 у вигляді графіка змін обсягу пухлини і на фіг. 35, де продемонстровано гальмування росту пухлини (% TGI) у вигляді відсотка від контрольного показника.

35 Результати експериментів, представлені на графіках на фіг. 34 і 35, показують, що введення злитого протеїну за винаходом у відповідності з прикладом 6, прикладом 19 призводить до гальмування росту пухлини MES-SA/Dx5, з TGI (індексом росту пухлини), відповідно, 99,7 % і 99,7 %, у порівнянні з контрольною групою, на 33-й день експерименту. У випадку з 40 rhTRAIL 114-281, який застосовували як посилювальний препарат, був отриманий незначний гальмівний вплив на ріст пухлинних клітин, у порівнянні з контрольною групою, при TGI на рівні 29 %. Таким чином, злиті протеїни за винаходом надають набагато більш сильного впливу порівняно з дією тільки rhTRAIL 114-281.

45 Тестовані злиті протеїни не викликали значних побічних ефектів, що проявляються у зниженні маси тіла мишей (тобто менше 10 % від маси вихідного рівня). Це свідчить про низьку системну токсичність білка.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АДAMEД СП. 3 О.О.
 Pieczykolan, Jerzy Szczepan
 Pawlak, Sebastian Dominik
 Ierek, Bartomiej Maciej
 Ryzga, Piotr Kamil

<120> Протираковий злитий протеїн

<130> KP4

<150> PL393578
 <151> 2010-01-05

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fusion protein sequence

<400> 1

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala
 1 5 10 15

His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn
 20 25 30

Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser
 35 40 45

Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly
 50 55 60

Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys
 85 90 95

Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile
 100 105 110

Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu
 115 120 125

Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu
 130 135 140

Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met
 145 150 155 160

Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
165 170

<210> 2
<211> 199
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 2

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Thr Ser Glu Glu
1 5 10 15

Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val
20 25 30

Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg
35 40 45

Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala
50 55 60

Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser
65 70 75 80

Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu
85 90 95

Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu
100 105 110

Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile
115 120 125

Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala
130 135 140

Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile
145 150 155 160

Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val
165 170 175

Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe
180 185 190

Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
195

<210> 3

<211> 230
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> fusion protein sequence
 <400> 3
 Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala
 1 5 10 15
 His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn
 20 25 30
 Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser
 35 40 45
 Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly
 50 55 60
 Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys
 85 90 95
 Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile
 100 105 110
 Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu
 115 120 125
 Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu
 130 135 140
 Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met
 145 150 155 160
 Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly Gly Gly Gly
 165 170 175
 Pro Leu Gly Leu Ala Gly Arg Val Val Arg Thr Met Pro Phe Leu Phe
 180 185 190
 Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Tyr Trp Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala
 210 215 220
 Ser Leu Asn Pro Glu Arg
 225 230

<210> 4
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fusion protein sequence

<400> 4

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

Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile
 20 25 30

Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
 35 40 45

Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
 50 55 60

Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
 65 70 75 80

Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
 85 90 95

Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
 100 105 110

Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
 115 120 125

Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
 130 135 140

Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
 145 150 155 160

Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
 165 170 175

Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 180 185

<210> 5
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fusion protein sequence

<400> 5

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly
1 5 10 15
Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile
20 25 30
Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys
35 40 45
Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg
50 55 60
Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu
65 70 75 80
Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe
85 90 95
Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met
100 105 110
Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu
115 120 125
Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly
130 135 140
Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp
145 150 155 160
Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His
165 170 175
Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
180 185

<210> 6
<211> 222
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 6

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly
1 5 10 15
Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys
20 25 30
Ala Ala cys Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln

```

          35              40              45
Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala
 50      55      60
Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
 65      70      75      80
Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
      85      90      95
Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
      100      105      110
Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln
      115      120      125
Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
      130      135      140
Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
      145      150      155      160
Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
      165      170      175
Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
      180      185      190
Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
      195      200      205
Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
      210      215      220

<210> 7
<211> 168
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 7
Cys Asn Gly Arg Cys Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 1      5      10      15
Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
      20      25      30
Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
      35      40      45

```

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
50 55 60

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
65 70 75 80

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
85 90 95

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
100 105 110

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
115 120 125

Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
130 135 140

Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
145 150 155 160

Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
165

<210> 8
<211> 201
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 8

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly Gly Gly Gly Ser Thr Ser
1 5 10 15

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
20 25 30

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
35 40 45

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
50 55 60

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
65 70 75 80

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
85 90 95

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe

100 105 110
 Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 115 120 125
 Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 130 135 140
 Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 165 170 175
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 180 185 190
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200
 <210> 9
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> fusion protein sequence
 <400> 9
 Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 1 5 10 15
 Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Pro Gln Arg
 20 25 30
 Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser
 35 40 45
 Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser
 50 55 60
 Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu
 65 70 75 80
 Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 85 90 95
 Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 100 105 110
 Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro
 115 120 125

Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys
130 135 140

Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu
145 150 155 160

Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu
165 170 175

Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
180 185 190

<210> 10
<211> 216
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 10

Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
1 5 10 15

Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Thr Ser Glu
20 25 30

Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu
35 40 45

Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
50 55 60

Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
85 90 95

Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
100 105 110

Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
115 120 125

Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
130 135 140

Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
145 150 155 160

Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser

165 170 175
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 180 185 190
 Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
 195 200 205
 Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215
 <210> 11
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> fusion protein sequence
 <400> 11
 Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 1 5 10 15
 Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Cys
 20 25 30
 Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val
 35 40 45
 Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro
 50 55 60
 Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile
 85 90 95
 Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu
 100 105 110
 His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr
 115 120 125
 Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn
 130 135 140
 Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser
 145 150 155 160
 Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp
 165 170 175

Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile
180 185 190

Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu
195 200 205

His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu
210 215 220

Val Gly
225

<210> 12
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fusion protein sequence

<400> 12

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
1 5 10 15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser
20 25 30

Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn Pro Glu Arg Val Val Arg Pro
35 40 45

Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
50 55 60

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
65 70 75 80

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
85 90 95

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
100 105 110

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
115 120 125

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
130 135 140

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
145 150 155 160

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr

165 170 175
 Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 180 185 190
 Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 195 200 205
 Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215
 <210> 13
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> fusion protein sequence
 <400> 13
 Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn
 1 5 10 15
 Pro Glu Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu Ala Gly Gly Gly Gly Arg
 20 25 30
 Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser
 35 40 45
 Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser
 50 55 60
 Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu
 65 70 75 80
 Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 85 90 95
 Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 100 105 110
 Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro
 115 120 125
 Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys
 130 135 140
 Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu
 165 170 175

Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys
195 200 205

Asn Phe Ala Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
210 215 220

<210> 14

<211> 181

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> fusion protein sequence

<400> 14

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu
1 5 10 15

Ala Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg
20 25 30

Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly
35 40 45

Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu
50 55 60

Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly
65 70 75 80

Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile
85 90 95

Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys
100 105 110

Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn
115 120 125

Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln
130 135 140

Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val
145 150 155 160

Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly
165 170 175

Ala Phe Leu Val Gly

180

<210> 15
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> fusion protein sequence
 <400> 15

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Thr Ser
 20 25 30

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 35 40 45

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 50 55 60

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 85 90 95

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 100 105 110

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 115 120 125

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 130 135 140

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 145 150 155 160

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
 180 185 190

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
 195 200 205

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 210 215

<210> 16
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<300>
 <308> GenBank/P50591
 <309> 1996-10-01
 <313> (1)..(281)

<400> 16

Met Ala Met Met Glu Val Gln Gly Gly Pro Ser Leu Gly Gln Thr Cys
 1 5 10 15

Val Leu Ile Val Ile Phe Thr Val Leu Leu Gln Ser Leu Cys Val Ala
 20 25 30

Val Thr Tyr Val Tyr Phe Thr Asn Glu Leu Lys Gln Met Gln Asp Lys
 35 40 45

Tyr Ser Lys Ser Gly Ile Ala Cys Phe Leu Lys Glu Asp Asp Ser Tyr
 50 55 60

Trp Asp Pro Asn Asp Glu Glu Ser Met Asn Ser Pro Cys Trp Gln Val
 65 70 75 80

Lys Trp Gln Leu Arg Gln Leu Val Arg Lys Met Ile Leu Arg Thr Ser
 85 90 95

Glu Glu Thr Ile Ser Thr Val Gln Glu Lys Gln Gln Asn Ile Ser Pro
 100 105 110

Leu Val Arg Glu Arg Gly Pro Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly
 115 120 125

Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu
 130 135 140

Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly
 145 150 155 160

His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile
 165 170 175

His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe
 180 185 190

Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln
 195 200 205

Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys
 210 215 220

Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr
225 230 235 240

Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile
245 250 255

Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala
260 265 270

Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
275 280

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<308> GenBank/AAI72307.1
<309> 2009-03-16
<313> (333)..(339)

<400> 17

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg
1 5

<210> 18
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<308> GenBank/AAF72632.1
<309> 2000-05-30
<313> (74)..(98)

<400> 18

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala
1 5 10 15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu
20 25

<210> 19
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<300>
<308> GenBank/AAF72632.1
<309> 2000-05-30
<313> (197)..(214)

<400> 19

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Leu Asn
1 5 10 15

Pro Glu

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic peptide
 <300>
 <301> Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.
 <302> Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature
 <303> Science (Washington DC)
 <304> 279
 <305> 5349
 <306> 377-380
 <307> 1998-01-16
 <313> (1)..(5)

<400> 20

Cys Asn Gly Arg Cys
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic construct

<300>
 <308> PDB/1FUL_A
 <309> 2009-07-10
 <313> (2)..(10)

<400> 21

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
 1 5

<210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<300>
 <301> Khachigian LM, Owensby DA, Chesterman CN.
 <302> A tyrosinated peptide representing the alternatively spliced exon
 of the platelet-derived growth factor A-chain binds specifically
 to cultured cells and interferes with binding of several growth
 factors.
 <303> Journal of Biological Chemistry
 <304> 25
 <305> 267
 <306> 1660-1666
 <307> 1992-01-25

<300>
 <301> Khachigian LM, Field SL, Crouch R, Chesterman CN
 <302> Platelet-derived growth factor A-chain synthetic peptide inhibits

human glioma xenograft proliferation in nude mice.
 <303> Anticancer Res
 <304> 15
 <305> 2
 <306> 337-41
 <307> 1995-04-05
 <400> 22
 Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 1 5 10 15

Lys Pro Thr

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<300>
 <308> GenBank/AAI67147.1
 <309> 2008-05-05
 <313> (453)..(460)

<400> 23

Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu
 1 5

<210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> protease cutting sequence

<400> 24

Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 1 5

<210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> protease cutting sequence

<400> 25

Arg Val Val Arg
 1

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial sequence of steric linker

<400> 26

Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence of steric linker

<400> 27

Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys
1 5 10

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence of steric linker

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<308> GenBank/CAA94521.1

<309> 1996-06-13

<313> (122)..(124)

<400> 29

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<300>

<308> GenBank/CAA94521.1

<309> 1996-06-13

<313> (122)..(126)

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 31

```

<211> 519
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial construct

<400> 31
cgtaaacgca aaaaaagtcg tggtagtggt ggtggccgcg ttgcggcaca tattacgggt      60
accctgtggc gcagcaacac gctgagctct ccgaattcga aaaatgaaaa agcactgggc      120
cgcaaaatta actcgtggga aagcagtcgt tctggtcaca gctttctgtc gaatctgcac      180
ctgcgcaatg gtgaactggt gattcatgaa aaaggctttt actatatcta ttctcagacg      240
tattttcgtt ttcaggaaga aattaaagaa aacacaaaaa atgacaaaca gatggtgcag      300
tacatttaca aatacaccag ttacccggac ccgattctgc tgatgaaaag cgcccgtaac      360
tcatgctgga gcaaagacgc tgaatatggc ctgtattcta tttatcaggg tggcatcttc      420
gaactgaaag aaaacgatcg tatttttgtt tcggtgacca acgaacacct gattgatatg      480
gatcatgaag catcgttttt cggcgcgttt ctggtcggc      519


<210> 32
<211> 597
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial construct

<400> 32
cgaaacgta aaaaaagccg tggtagtggt ggtggcacca gcgaagaaac cattagcacc      60
gttcaggaaa aacagcagaa tattagtcgg ctggttcgtg aacgtggtcc gcagcgtggt      120
gcagcacata ttaccggcac ccgtggtcgt agcaataccc tgagcagccc gaatagcaaa      180
aatgaaaaag cactgggtcg caaaattaat agctgggaaa gcagccgtag cggtcatagc      240
tttctgagca atctgcatct gcgtaatggt gaactggtga ttcataaaaa aggcttttat      300
tataattata gccagaccta ttttcgcttt caggaagaaa ttaaagaaaa taccaaaaat      360
gataaataaa tggtagcagta tatctataaa tacaccagct atccggatcc gattctgctg      420
atgaaaagcg cacgtaatag ctgttgagc aaagatgcag aatatggtct gtatagcatt      480
tatcagggtg gcatttttga actgaaagaa aatgatcgca tttttgtgag cgtgaccaat      540
gaacatctga ttgatatgga tcatgaagcc agcttttttg gtgcatttct ggtgggt      597


<210> 33
<211> 690
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial construct

<400> 33
cgtaaacgta aaaaaagccg tggtagtggt ggcggtcgtg ttgcagcaca tattaccggc      60

```

```

accctgtggc gtagcaatac cctgagcagc ccgaatagca aaaatgaaaa agcactgggt 120
cgcaaaatta atagctggga aagcagccgt agcggtcata gctttctgag caatctgcat 180
ctgcgtaatg gtgaactggg gattcatgaa aaaggctttt attatatatta tagccagacc 240
tattttcgct ttcaggaaga aattaaagaa aataccaaaa atgataaaca aatgggtgcag 300
tacatttaca aatataccag ctatccggat ccgattctgc tgatgaaaag cgcacgtaat 360
agctgttggg gcaaagatgc agaatatggg ctgtatagca tttatcaggg tggcattttt 420
gaactgaaag aaaatgatcg cttttttgtg agcgtgacca atgaacatct gattgatatg 480
gatcatgaag ccagcttttt tgggtgcatth ctggttgggt gcgggtggcc gctgggtctg 540
gcaggtcgtg ttgttcgtac catgccgttt ctgttttgca atgttaatga tgtgtgcaat 600
tttgccagcc gcaatgatta tagctattgg ctgtgcaatt attatagcaa tagctatagc 660
ttttggctgg ctagtctgaa tccggaacgt 690

```

<210> 34
 <211> 561
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

```

<400> 34
cgcaaacgta aaaaaagccg tccgctgggt attgccgggt aacgtaaacg caaaaaatct 60
cgtgggtggg gtggcggtcg tgttgagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120
accctgagca gcccgaaatg caaaaatgaa aaagccctgg gtcgcaaaat taatagctgg 180
gaaagcagcc gtagcgggtc tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tgggtgaactg 240
gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctattttcg ctttcaggaa 300
gaaattaaag aaaacaccaa aaatgataaa caaatgggtg agtataatcta taaatacacc 360
agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat 420
gcagaatatg gcctgtatag catttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat 480
cgcatTTTTT tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt 540
tttgggtgcat ttctgggtggg t 561

```

<210> 35
 <211> 561
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

```

<400> 35
cgtaaacgta aaaaaagccg tgtgttctgt ccgctgggta ttgccggtga acgtaaacgc 60
aaaaaatcac gtgggtggcg tgttgagca catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat 120
accctgagca gcccgaaatg caaaaatgaa aaagcactgg gtcgcaaaat taatagctgg 180

```

gaaagcagcc gtagcgggtca tagctttctg agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg	240
gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt tatagccaga cctatttttcg ctttcaggaa	300
gaaattaaag aaaataccaa aaatgataaa caaatgggtgc agtacattta caaatatacc	360
agctatccgg atccgattct gctgatgaaa agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat	420
gcagaatatg gtctgtatag cttttatcag ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat	480
cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat ctgattgata tggatcatga agccagcttt	540
tttggtgcat ttctggttgg t	561

<210> 36
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 36	
cgtaaacgta aaaaaagccg tgttggtcgt ccgctgggta ttgcagggtga acgtaaacgt	60
aaaaaaagcc gtggtggtgg ttgtgcagca gcatgtgcag catgtaccag cgaagaaacc	120
attagcaccg ttcaggaaaa acagcagaat attagcccg cgtgttcgtga acgtggtccg	180
cagcgtgttg cagcacatat taccggtacc cgtggtcgta gcaataccct gagcagcccg	240
aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgt aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc	300
ggatcatagct ttctgagcaa tctgcatctg cgtaatgggtg aactggttat tcatgaaaaa	360
ggttttttatt atatttatag ccagacctat tttcgttttc aggaagaaat taaagaaaat	420
acaaaaaatg ataaacagat ggttcagtat atttataaat ataccagcta tccggatccg	480
attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc tgttggtgagca aagatgcaga atatggtctg	540
tatagcattt atcagggtgg tatttttgaa ctgaaagaaa atgacgctat ttttggttagc	600
gttaccaatg aacatctgat tgatatggat catgaagcaa gcttttttgg tgcatttctg	660
gttggt	666

<210> 37
 <211> 505
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 37	
tgtaatggtc gttgtccgca gcgtgttgca gcacatatta ccggcaccgg tggatcgtagc	60
aataccctga gcagcccga tagcaaaaat gaaaaagccc tgggtcgcaa aattaatagc	120
tgggaaagca gccgtagcgg tcatagcttt ctgagcaatc tgcattctcg taatggtgaa	180
ctggtgattc atgaaaaagg cttttattat atttatagcc agacctattt tcgctttcag	240
gaagaaatta aagaaaacac caaaaatgat aaacaaatgg tgcagtatat ctataaatac	300

accagctatc cggatccgat tctgctgatg aaaagcgcac gtaatagctg ttggagcaaa	360
gatgcagaat atggcctgta tagcatttat caggggtggca tttttgaact gaaagaaaat	420
gatcgcatTT ttgtgagcgt gaccaatgaa catctgattg atatggatca tgaaagccag	480
cttttttggg gcatttctgg tgggt	505

<210> 38
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 38	
tgtgaatgtg gcggtgaatg tttttgtggg ggcggtagca ccagtgaaga aaccattagc	60
accgttcaag aaaaacagca gaattattagt ccgctggttc gtgaacgtgg tccgcagcgt	120
gttgagcac atattaccgg caccctgtgt cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc	180
aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatc aatagctggg aaagcagccg tagcgggtcat	240
agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttc	300
tactatatct acagccagac ctattttcgc ttccaagaag aaatcaaaga gaacaccaaa	360
aacgacaaac aaatggtgca gtacatctac aaatatacca gctatccgga tccgattctg	420
ctgatgaaaa gcgcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg tctgtatagc	480
atttatcagg gtggcatctt tgagctgaaa gaaaatgatc gcatctttgt tagcgtgacc	540
aacgaacatc tgatcgatat ggatcatgaa gccagctttt ttggtgcatt tctggtgggt	600

<210> 39
 <211> 576
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 39	
tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgacccgt	60
gttggtcgtc cgctgggtct ggcagggtccg cagcgtgttg cagcacatat taccggcacc	120
cgtggtcgtg gcaataccct gaggagcccc aatagcaaaa atgaaaaagc cctgggtcgt	180
aaaattaata gctgggaaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg	240
cgtaatggcg aactggtgat tcatgaaaaa ggctttttatt atatttatag ccagacctat	300
tttcgctttc aggaagaaat taaagaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtat	360
atctataaat ataccagcta tccggatccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc	420
tggtggagca aagatgccga atatggtctg tatagcattt atcaggggtg catttttgaa	480
ctgaaagaaa atgatcgcat ttttgtgagc gtgaccaatg aacatctgat tgatatggat	540
catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gttgggt	576

<210> 40
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 40
 tatggtcgtc cgctgcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgacccgt 60
 gttgttcgtc cgctgggtct ggcaggcacc agcgaagaaa ccattagcac cgttcaggaa 120
 aaacagcaga atattagtcc gctgggtcgt gaacgtgggtc cgagcgtgtg tgcagcacat 180
 attaccggca cccgtgggtc tagcaatacc ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa 240
 gcaactgggtc gcaaaattaa tagctgggaa agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc 300
 aatctgcacg tgcgtaaatg tgaactgggtg attcatgaaa aaggctttta ttatatttat 360
 agccagacct attttcgctt tcaggaagaa attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacia 420
 atggtgcagt atatctataa atacaccagc tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc 480
 gcacgtaata gctgttggag caaagatgca gaatatgggtc tgtatagcat ttatcagggt 540
 ggcatttttg aactgaaaga aaatgatcgc atttttgtga gcgtgaccaa tgaacatctg 600
 attgatatgg atcatgaagc cagctttttt ggtgcatttc tgggtgggt 648

<210> 41
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 41
 tatggtcgtc cgctgcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgtctgaa accgacccgt 60
 gttgttcgtc cgctgggtct ggcagggtgt ggttgtgcag cagcatgtgc agcatgtacc 120
 agcgaagaaa ccattagcac cgttcaggaa aaacagcaga atattagccc gctgggtcgt 180
 gaacgtgggtc cgagcgtgtg tgcagcacat attaccggta cccgtgggtc tagcaatacc 240
 ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa gcaactgggtc gtaaaattaa tagctgggaa 300
 agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcacg tgcgtaaatg tgaactgggt 360
 attcatgaaa aagggtttta ttatatttat agccagacct attttcgttt tcaggaagaa 420
 attaaagaaa ataccaaaaa tgataaacag atggttcagt atatttataa atataccagc 480
 tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctgttggag caaagatgca 540
 gaatatgggtc tgtatagcat ttatcagggt ggtatttttg aactgaaaga aaatgatcgt 600
 atttttgtta gcgttaccaa tgaacatctg attgatatgg atcatgaagc aagctttttt 660
 ggtgcatttc tgggtgggt 678

<210> 42

<211> 651
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial construct

<400> 42
accatgccgt ttctgttttg caatgttaat gatgtgtgca attttgccag ccgcaatgat 60
tatagctatt ggctgtgcaa ttattatagc aatagctata gcttttggtt ggcttctctg 120
aatccggaac gtgttggttcg tccgctgggt ctggcaggcg gtggtggtcg tgttgacgca 180
catattaccg gcacccgtgg tcgtagcaat accctgagca gcccgaaatag caaaaatgaa 240
aaagcactgg gtcgcaaaat taatagctgg gaaagcagcc gtacggttca tagctttctg 300
agcaatctgc atctgcgtaa tggatgaactg gtgattcatg aaaaaggctt ttattatatt 360
tatagccaga cctatttttcg ctttcaggaa gaaattaaag aaaataccaa aaatgataaa 420
caaatggtgc agtacattta caaatatacc agctatccgg atccgattct gctgatgaaa 480
agcgacgta atagctgttg gagcaaagat gcagaatatg gtctgtatag cttttatcag 540
ggtggcattt ttgaactgaa agaaaatgat cgcatttttg tgagcgtgac caatgaacat 600
ctgattgata tggatcatga agccagcttt tttggtgcat ttctggttgg t 651

<210> 43
<211> 660
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial construct

<400> 43
tgcaattatt atagcaatag ctatagcttt tggctggcaa gcctgaatcc ggaacgtgtt 60
gttcgtccgc tgggtctggc tgggggtggc ggtcgtgttg cagcacatat taccggcacc 120
cgtggtcgta gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc 180
aaaattaata gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg 240
cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttatt atatttatag ccagacctat 300
tttcgctttc aggaagaaat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtac 360
atttacaat ataccagcta tccggatccg attctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc 420
tgttgagca aagatgcaga atatggtctg tatagcattt atcaggggtg ctttttgaa 480
ctgaaagaaa atgatcgcat ttttgtgagc gtgaccaatg aacatctgat tgatatggat 540
catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gttggtggcg gtggtactat gccgtttctg 600
ttttgcaatg ttaatgatgt gtgcaatttt gccagccgca atgattatag ctattggctg 660

<210> 44
<211> 543
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 44
 ctgggtctgc gtagcctgcg tgaacgtgtt gttcgtccgc tgggtctggc aggtccgcag 60
 cgtgttgacag cacatattac cggcaccctg ggtcgtagca ataccctgag cagcccgaat 120
 agcaaaaatg aaaaagccct gggtcgtaaa attaatagct gggaaagcag ccgtagcggc 180
 catagctttc tgagcaatct gcatctgcgt aatggcgaaac tgggtgattca tgaaaaaggc 240
 ttttattata tttatagcca gacctatttt cgctttcagg aagaaattaa agaaaatacc 300
 aaaaatgata aacaaatggc gcagtatatc tataaatata ccagctatcc ggatccgatt 360
 ctgctgatga aaagcgcacg taatagctgt tggagcaaag atgccgaata tgggtctgtat 420
 agcatttatc aggggtggcat ttttgaactg aaagaaaatg atcgcatttt tgtgagcgtg 480
 accaatgaac atctgattga tatggatcat gaagccagct tttttggtgc atttctggtt 540
 ggt 543

<210> 45
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial construct

<400> 45
 ctgggtctgc gtagcctgcg tgaacgtgtt gttcgtccgc tgggtctggc aggtccgggt 60
 ggtggtttgt cagcagcatg tgcagcatgt accagcgaag aaaccattag caccgttcag 120
 gaaaaacagc agaatattag cccgctgggt cgtgaacgtg gtccgcagcg tgttgacagc 180
 catattaccg gtacccgtgg tcgtagcaat accctgagca gcccgaaatg caaaaatgaa 240
 aaagcactgg gtcgtaaaat taatagctgg gaaagcagcc gtagcgggtca tagctttctg 300
 agcaatctgc atctgcgtaa tgggtgaactg gttattcatg aaaaagggtt ttattatatt 360
 tatagccaga cctatttttcg ttttcaggaa gaaattaaag aaaataccaa aaatgataaa 420
 cagatgggtc agtatattta taaatatacc agctatccgg atccgattct gctgatgaaa 480
 agcgcacgta atagctgttg gagcaaagat gcagaatatg gtctgtatag catttatcag 540
 ggtggtattt ttgaactgaa agaaaatgat cgtatttttg tttagcgttac caatgaacat 600
 ctgattgata tggatcatga agcaagcttt tttggtgcat ttctggttgg t 651

<210> 46
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 46

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly

1	5	10	15
Glu Arg Lys	Arg Lys Lys Ser Arg	Thr Ser Glu Glu Thr	Ile Ser Thr
	20	25	30
Val Gln Glu	Lys Gln Gln Asn	Ile Ser Pro Leu Val	Arg Glu Arg Gly
	35	40	45
Pro Gln Arg	Val Ala Ala His	Ile Thr Gly Thr	Arg Gly Arg Ser Asn
	50	55	60
Thr Leu Ser	Ser Pro Asn Ser Lys	Asn Glu Lys Ala Leu	Gly Arg Lys
	65	70	75
Ile Asn Ser	Trp Glu Ser Ser Arg	Ser Gly His Ser Phe	Leu Ser Asn
	85	90	95
Leu His Leu	Arg Asn Gly Glu Leu	Val Ile His Glu Lys	Gly Phe Tyr
	100	105	110
Tyr Ile Tyr	Ser Gln Thr Tyr Phe	Arg Phe Gln Glu	Glu Ile Lys Glu
	115	120	125
Asn Thr Lys	Asn Asp Lys Gln Met	Val Gln Tyr Ile	Tyr Lys Tyr Thr
	130	135	140
Ser Tyr Pro	Asp Pro Ile Leu Leu	Met Lys Ser Ala Arg	Asn Ser Cys
	145	150	155
Trp Ser Lys	Asp Ala Glu Tyr Gly	Leu Tyr Ser Ile Tyr	Gln Gly Gly
	165	170	175
Ile Phe Glu	Leu Lys Glu Asn Asp	Arg Ile Phe Val Ser	Val Thr Asn
	180	185	190
Glu His Leu	Ile Asp Met Asp His	Glu Ala Ser Phe	Phe Gly Ala Phe
	195	200	205
Leu Val Gly			
	210		

<210> 47
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 47

Arg Lys Arg Lys	Lys Ser Arg Val	Val Arg Pro Leu Gly	Ile Ala Gly
1	5	10	15

Glu Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys
 20 25 30
 Ala Ala Cys Gly Ser Gly Gln Arg Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr
 35 40 45
 Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys
 50 55 60
 Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His
 65 70 75 80
 Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His
 85 90 95
 Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln
 100 105 110
 Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr
 115 120 125
 Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser
 130 135 140
 Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser
 145 150 155 160
 Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe
 165 170 175
 Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser
 180 185 190
 Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 195 200

<210> 48
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> artificial sequence

<400> 48

Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Val Val Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ser Gly Gln Arg
 20 25 30
 Val Ala Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser

35 40 45
 Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser
 50 55 60
 Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu
 65 70 75 80
 Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr
 85 90 95
 Ser Gln Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys
 100 105 110
 Asn Asp Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro
 115 120 125
 Asp Pro Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys
 130 135 140
 Asp Ala Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu
 165 170 175
 Ile Asp Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
 180 185 190
 <210> 49
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> artificial sequence
 <400> 49
 Tyr Gly Arg Pro Arg Gln Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 1 5 10 15
 Lys Pro Thr Arg Val Val Arg Pro Leu Gly Ile Ala Gly Glu Gly Gly
 20 25 30
 Gly Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ser Gly Gln Arg Val Ala
 35 40 45
 Ala His Ile Thr Gly Thr Arg Gly Arg Ser Asn Thr Leu Ser Ser Pro
 50 55 60
 Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys Ile Asn Ser Trp Glu
 65 70 75 80

Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn Leu His Leu Arg Asn
85 90 95
Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln
100 105 110
Thr Tyr Phe Arg Phe Gln Glu Glu Ile Lys Glu Asn Thr Lys Asn Asp
115 120 125
Lys Gln Met Val Gln Tyr Ile Tyr Lys Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Pro
130 135 140
Ile Leu Leu Met Lys Ser Ala Arg Asn Ser Cys Trp Ser Lys Asp Ala
145 150 155 160
Glu Tyr Gly Leu Tyr Ser Ile Tyr Gln Gly Gly Ile Phe Glu Leu Lys
165 170 175
Glu Asn Asp Arg Ile Phe Val Ser Val Thr Asn Glu His Leu Ile Asp
180 185 190
Met Asp His Glu Ala Ser Phe Phe Gly Ala Phe Leu Val Gly
195 200 205

<210> 50
<211> 633
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> artificial sequence

<400> 50
cgtaaacgta aaaaaagccg tgtgtgtcgt ccgctgggca ttgcgggcga acgtaaacgt 60
aaaaaaagcc gtaccagcga agaaaccatt agcaccgtgc aggaaaaaca gcagaacatt 120
agcccgtctg tgctgaacg tggcccgag cgtgtggcgg cgcatattac cggcaccggt 180
ggccgtagca acaccctgag cagcccgaac agcaaaaacg aaaaagcgct gggccgtaaa 240
attaacagct gggaaagcag ccgtagcggc catagctttc tgagcaacct gcatctgcgt 300
aacggcgaac tggtgattca tgaaaaaggc ttttattata tttatagcca gacctatatt 360
cgttttcagg aagaaattaa agaaaacacc aaaaacgata aacagatggt gcagtatatt 420
tataaatata ccagctatcc ggatccgatt ctgctgatga aaagcgcgcg taacagctgc 480
tggagcaaag atgcggaata tggcctgtat agcatttatc agggcggcat ttttgaactg 540
aaagaaaacg atcgtatatt tgtgagcgtg accaacgaac atctgattga tatggatcat 600
gaagcgagct tttttggcgc gtttctggtg ggc 633

<210> 51
<211> 600
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence

<400> 51

```
cgtaaacgta aaaaaagccg tgttgttcgt ccgctgggta ttgccggtga acgtaaacgc      60
aaaaaatcac gtggtggtgg ttgtgcagca gcatgtgcag cctgtggtag cggtcagcgt      120
gttgcagcac atattaccgg caccctgggt cgtagcaata ccctgagcag cccgaatagc      180
aaaaatgaaa aagcactggg tcgcaaaatt aacagctggg aaagcagccg tagcggtcatt      240
agctttctga gcaatctgca tctgcgtaat ggtgaactgg tgattcatga aaaaggcttt      300
tactacatct acagccagac ctatttccgc tttcaagaag agattaaaga aaatacaaaa      360
aatgataaac aaatggtgca gtatatttac aaatatacca gctatccgga tccgatcctg      420
ctgatgaaaa ggcacgtaa tagctgttgg agcaaagatg cagaatatgg cctgtatagc      480
atztatcagg gtggcatctt tgaactgaaa gaaaacgatc gtattttcgt gagcgtgacc      540
aatgaacatc tgatcgatat ggatcatgaa gccagctttt ttggtgcatt tctggtgggt      600
```

<210> 52

<211> 576

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence

<400> 52

```
cgtaaacgta aaaaaagccg tgttggtgct aaacgcaaaa aatcacgtgg tgggtggtgt      60
gcagcagcat gtgcagcctg tggtagcggc cagcgtgttg cagcacatat taccggcacc      120
cgtggctgta gcaataccct gagcagcccg aatagcaaaa atgaaaaagc actgggtcgc      180
aaaattaaca gctgggaaag cagccgtagc ggtcatagct ttctgagcaa tctgcatctg      240
cgtaatggtg aactggtgat tcatgaaaaa ggcttttact acatctacag ccagacctat      300
ttccgctttc aagaagagat taaagaaaat accaaaaatg ataaacaaat ggtgcagtat      360
atttacaat ataccagcta tccggatccg atcctgctga tgaaaagcgc acgtaatagc      420
tgttggagca aagatgcaga atatggcctg tatagcattt atcagggtgg catctttgaa      480
ctgaaagaaa acgatcgtat tttcgtgagc gtgaccaatg aacatctgat cgatatggat      540
catgaagcca gcttttttgg tgcatttctg gtgggt      576
```

<210> 53

<211> 676

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> artificial sequence

<400> 53

```
tatggtcgtc cgcgtcagag cggtaaaaaa cgtaaacgta aacgcctgaa accgacccgt      60
```

```

gttggtcgtc cgctgggtat tgccggtgaa ggtgggtggt gtgcagcagc atgtgcagcc 120
tgtggttagcg gtcagcgtgt tgcagcacat attaccggca cccgtgggtcg tagcaatacc 180
ctgagcagcc cgaatagcaa aaatgaaaaa gcactgggtc gcaaaatcaa tagctgggaa 240
agcagccgta gcggtcatag ctttctgagc aatctgcac tgcgtaatgg tgaactgggtg 300
attcatgaaa aaggctttta ttacatttat agccagacct atttccgctt tcaagaagaa 360
attaaagaaa ataccaaaaa tgataaaca atgggtgcagt atatttaca atataccagc 420
tatccggatc cgattctgct gatgaaaagc gcacgtaata gctgttggag caaagatgca 480
gaatatggtc tgtatagcat ttatcagggt ggcatttttg aactgaaaga aaatgatcgc 540
atTTTTgtga gcgtgaccaa tgaacatctg attgatatgg atcatgaagc cagctTTTT 600
ggTgcatttc tggTgggtta ataactcgag ggtacctgga gcacaagact ggcctcatgg 660
gccttccgct cactgc 676

```

```

<210> 54
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> flexible linker

```

```

<400> 54

```

```

Cys Gly Ser Gly
1

```

```

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 55

```

```

Pro Leu Gly Ile Ala Gly Glu
1 5

```

```

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 56

```

```

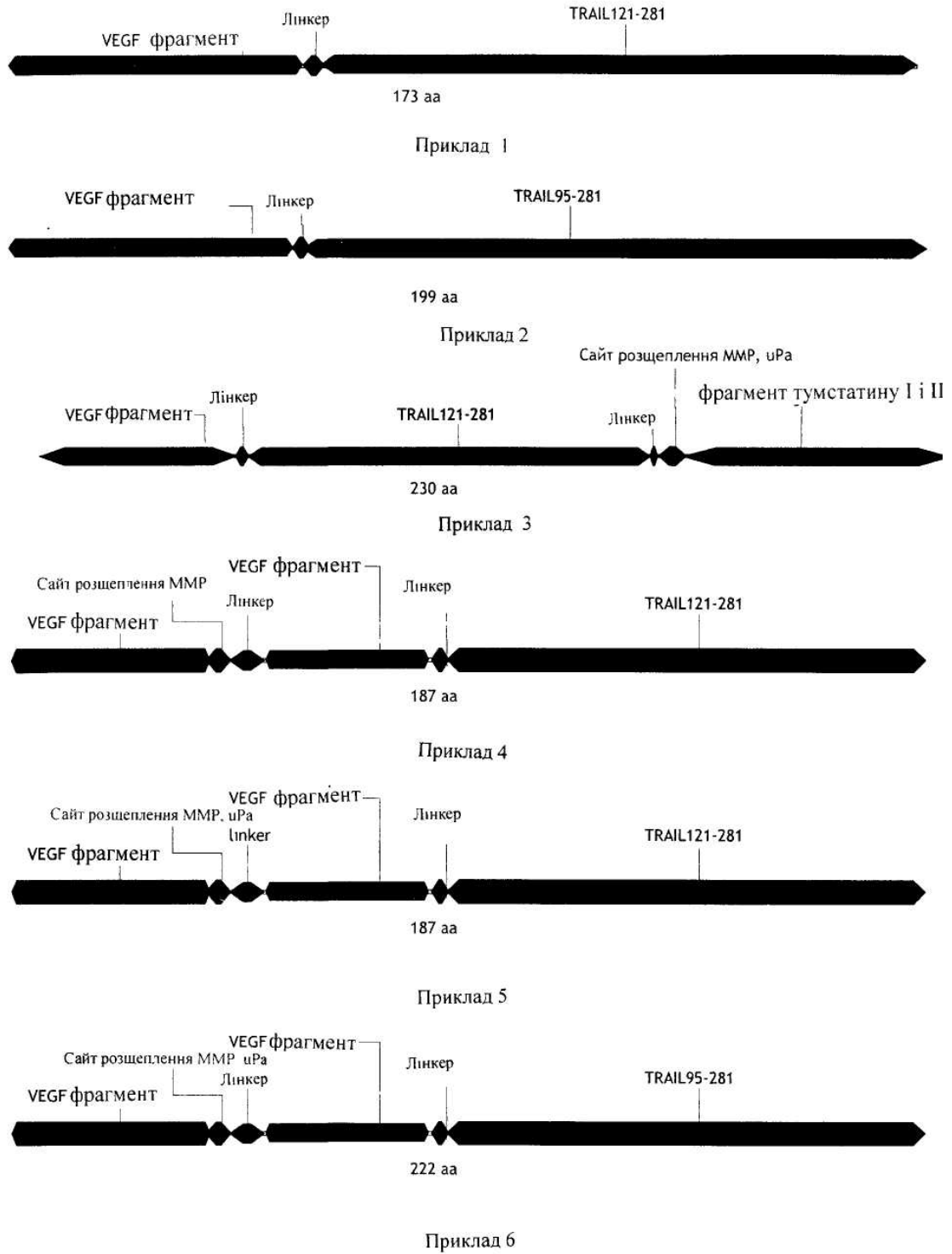
Pro Leu Gly Leu Ala Gly Glu Pro
1 5

```

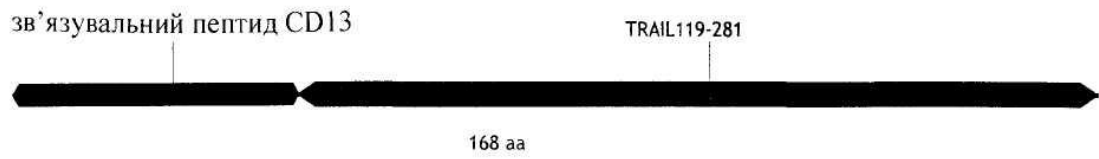
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Злитий протеїн, що містить:
 - домен (а), який включає функціональний фрагмент послідовності розчинного протеїну hTRAIL, причому даний фрагмент починається амінокислотою в позиції не нижче, ніж hTRAIL 95, або послідовність, що має принаймні 70 % ідентичність до функціонального фрагменту, і
 - домен (b), що являє собою послідовність антиангіогенного ефекторного пептиду, який є
- 10 інгібітором рецептора фактора росту і вибраний з групи фрагментів фактора росту, що містять фрагмент VEGF SEQ ID NO 17, фрагмент PDGF SEQ ID NO 22 і фрагмент EGF SEQ ID NO 23; при цьому послідовність домену (b) приєднана в точці С-кінця або точці N-кінця домену (а).

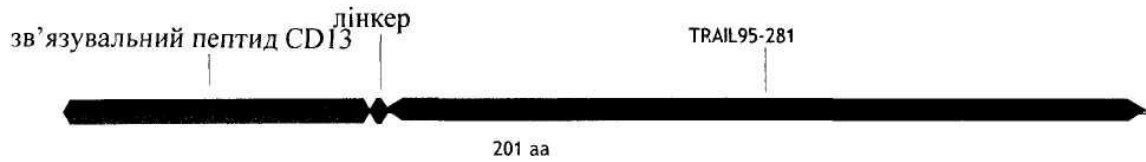
2. Злитий протеїн за п. 1, у якому домен (а) містить фрагмент послідовності розчинного протеїну hTRAIL, що починається амінокислотою з діапазону від hTRAIL 95 до hTRAIL 121, включно, а закінчується амінокислотою hTRAIL 281.
3. Злитий протеїн за п. 1 або п. 2, у якому домен (а) вибрано з групи, що складається з
5 hTRAIL 95-281, hTRAIL 119-281, hTRAIL 120-281 і hTRAIL 121-281.
4. Злитий протеїн за будь-яким з пп. 1-3, у якому даний злитий протеїн між доменом (а) і доменом (b) містить домен (с), що включає сайт протеазного розщеплення, вибраний з послідовності, розпізнаної металопротеазою MMP, послідовності, розпізнаної урокіназою uPA, і їх комбінацій.
- 10 5. Злитий протеїн за п. 4, у якому послідовністю, розпізнаною металопротеазою MMP, є SEQ ID NO 24, SEQ ID NO 55 або SEQ ID NO 56, послідовністю, розпізнаною урокіназою uPA, є SEQ ID NO 25.
6. Злитий протеїн за п. 4 або 5, у якому доменом (с) є комбінація розташованих поруч одна з одною послідовності, розпізнаної металопротеазою MMP, і послідовності, розпізнаної
15 урокіназою uPA.
7. Злитий протеїн за будь-яким з попередніх пунктів, у якому протеїн між доменами (а), (b), (с) і/або (d) додатково містить гнучкий гліциновий, гліцин-сериновий або цистеїновий стеричний лінкер або їх комбінації.
8. Злитий протеїн за п. 7, у якому гнучкий стеричний лінкер вибрано з групи, що складається з
20 GG, E, GGGCAAACAAC (SEQ ID NO 26), GGCAAACAAC (SEQ ID NO 27), GGGGG (SEQ ID NO 28), GGGG (SEQ ID NO 29), GGG (SEQ ID NO 30) і GSG (SEQ ID NO 54).
9. Злитий протеїн за п. 1, до складу якого входить амінокислотна послідовність, що відповідає послідовності, вибраній з групи, яка складається з SEQ ID NO 1; SEQ ID NO 2; SEQ ID NO 3; SEQ ID NO 4; SEQ ID NO 5; SEQ ID NO 6; SEQ ID NO 9; SEQ ID NO 10; SEQ ID NO 11; SEQ ID NO 14;
25 SEQ ID NO 15; SEQ ID NO 46; SEQ ID NO 47; SEQ ID NO 48 і SEQ ID NO 49.
10. Злитий протеїн за будь-яким з попередніх пунктів, яким є рекомбінантний протеїн.
11. Фармацевтична композиція, що містить як активний інгредієнт злитий протеїн за будь-яким з попередніх пп. 1-10 у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.
12. Фармацевтична композиція за п. 11, що виконана у формі для парентерального введення.
- 30 13. Фармацевтична композиція за п. 11 або 12 для застосування при лікуванні онкологічних захворювань у ссавців, включаючи людину.



Фіг. 1



Приклад 7



Приклад 8



Приклад 9

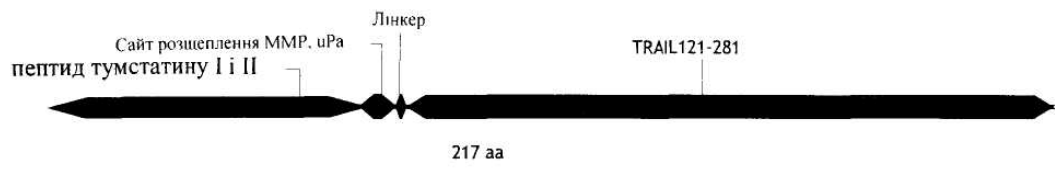


Приклад 10

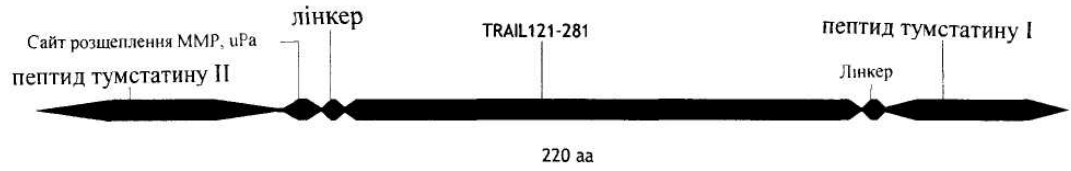


Приклад 11

Фіг. 2



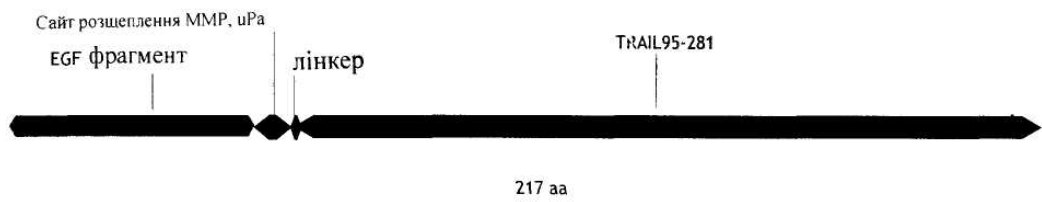
Приклад 12



Приклад 13

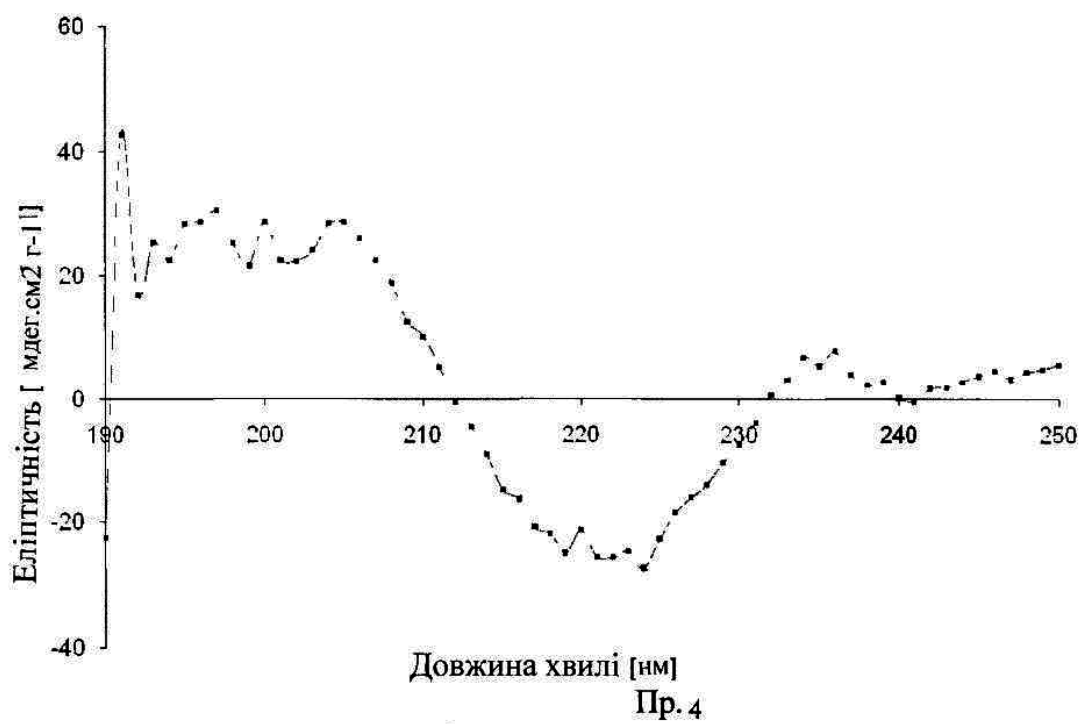
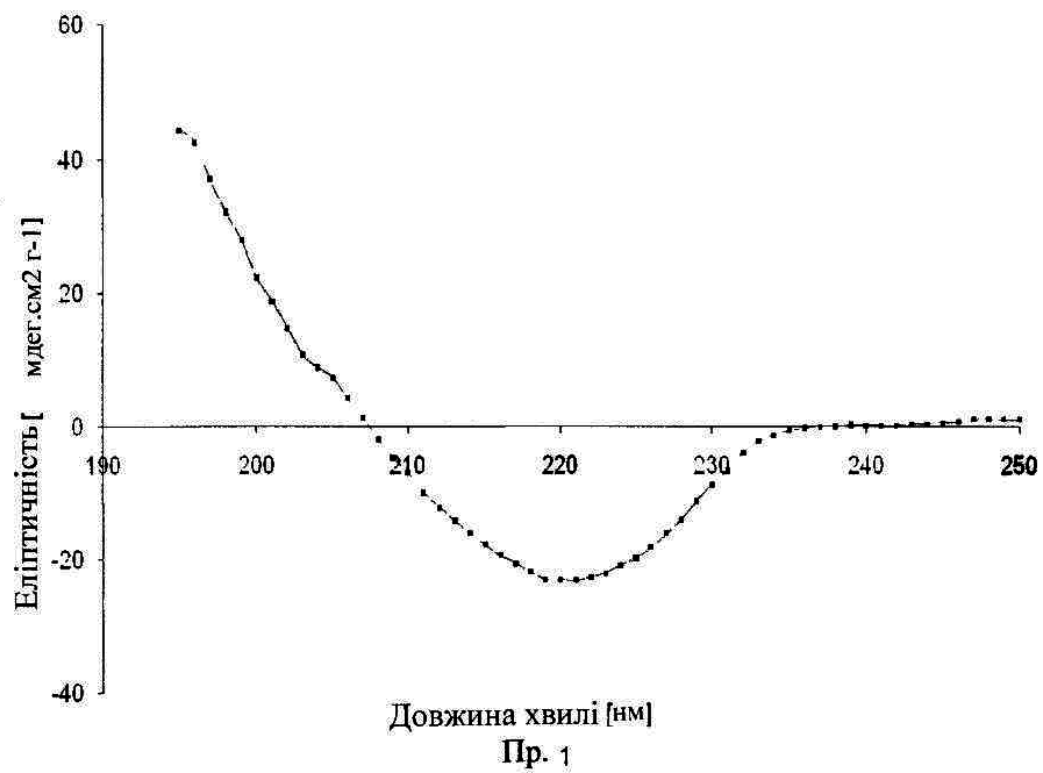


Приклад 14

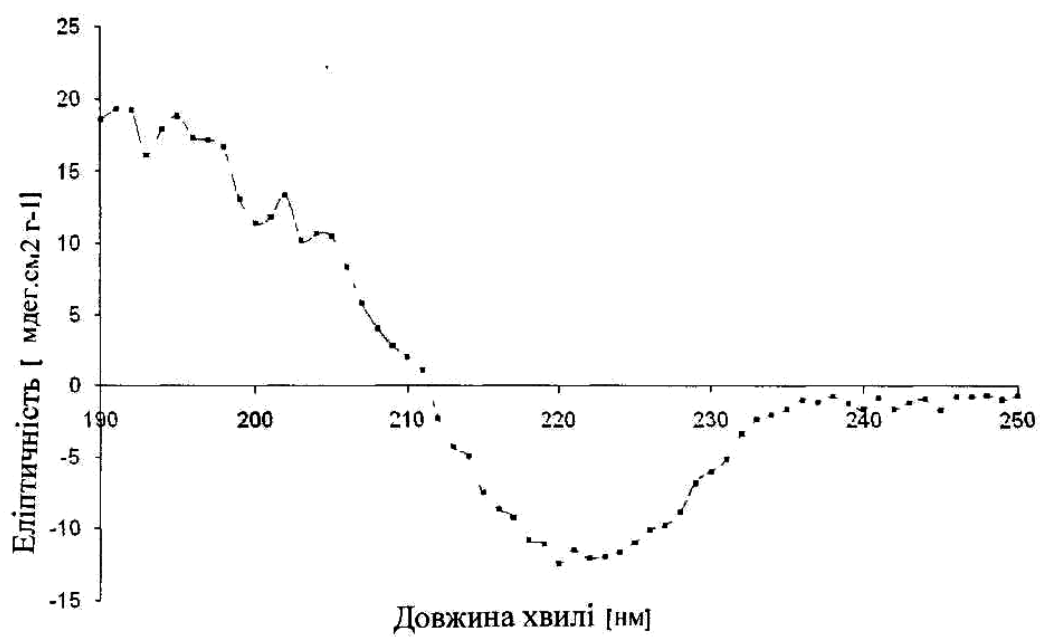
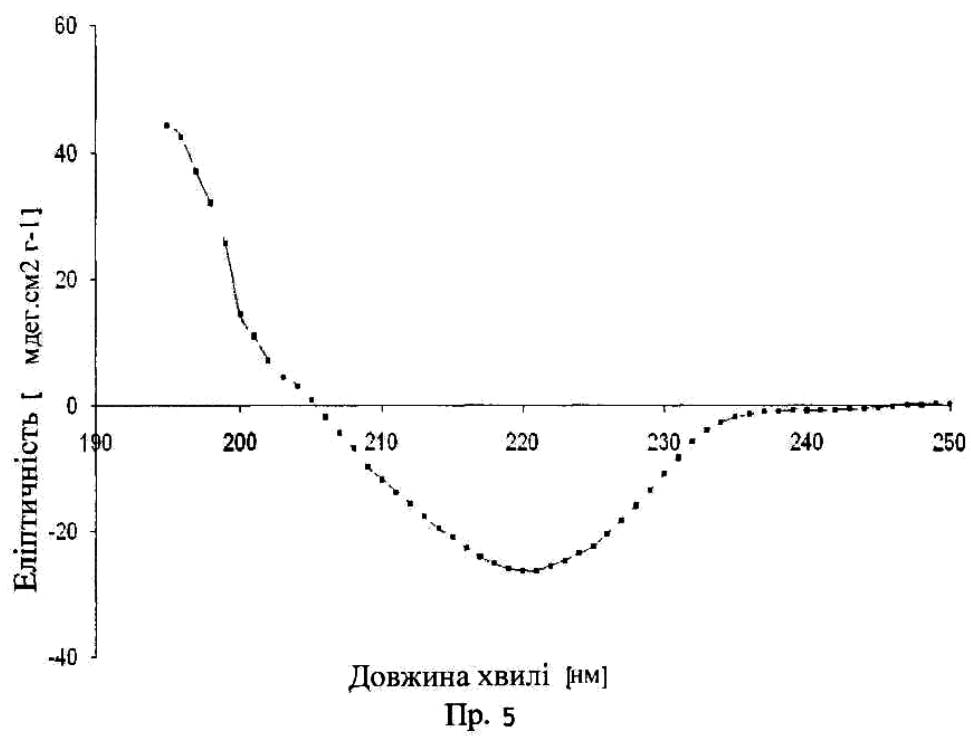


Приклад 15

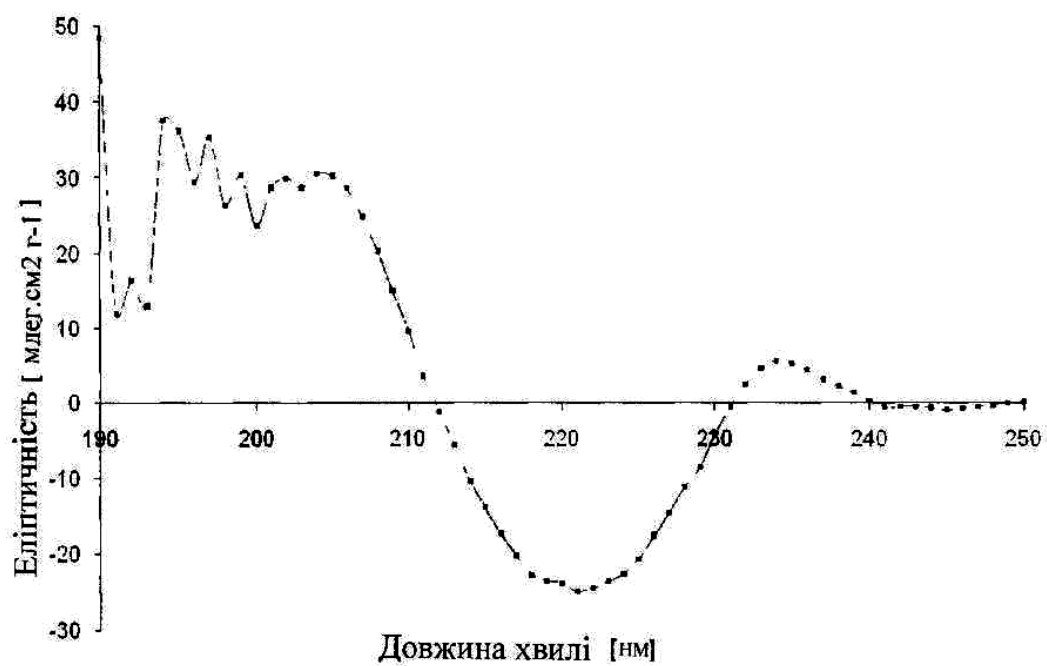
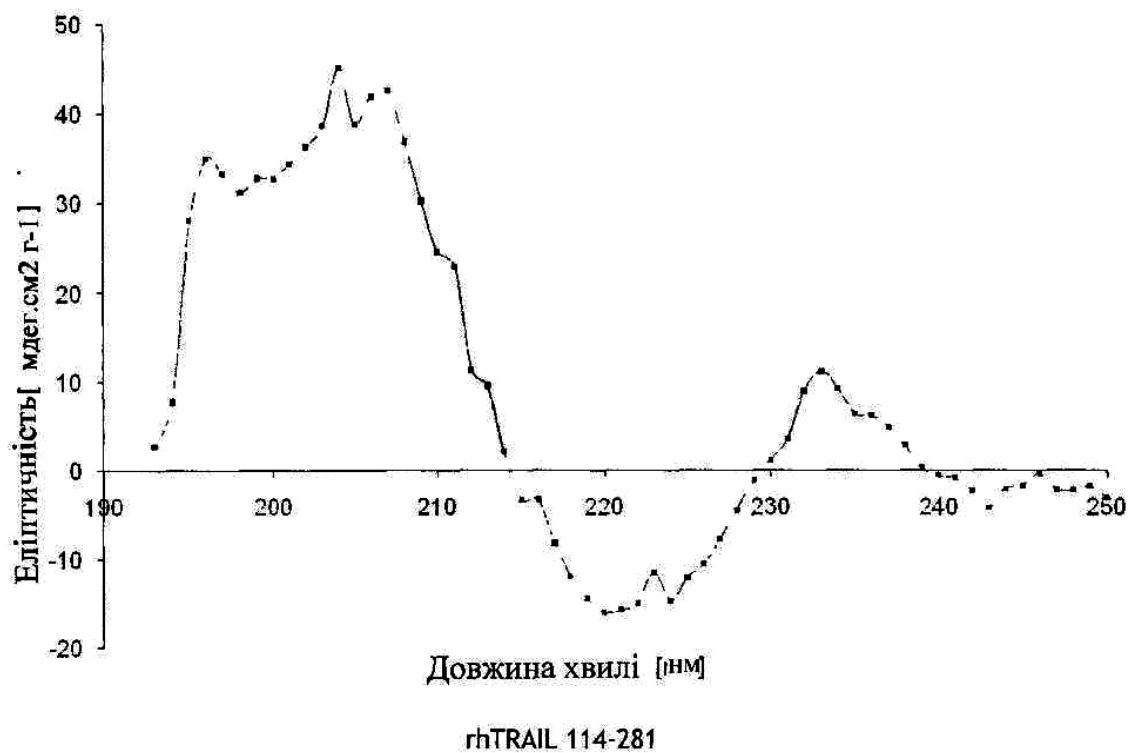
Фіг. 3



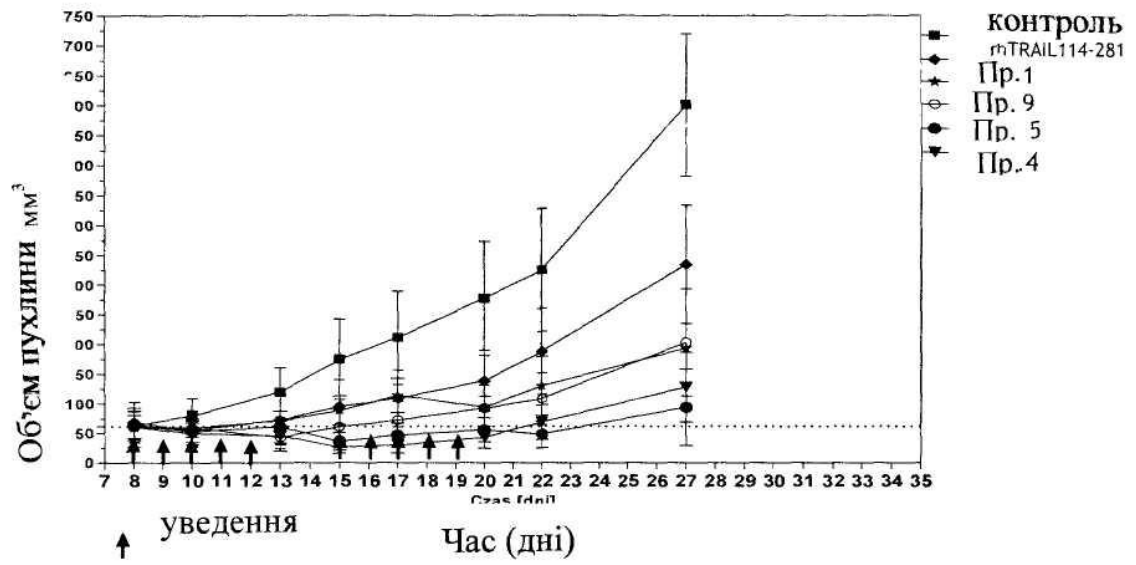
Фіг. 4



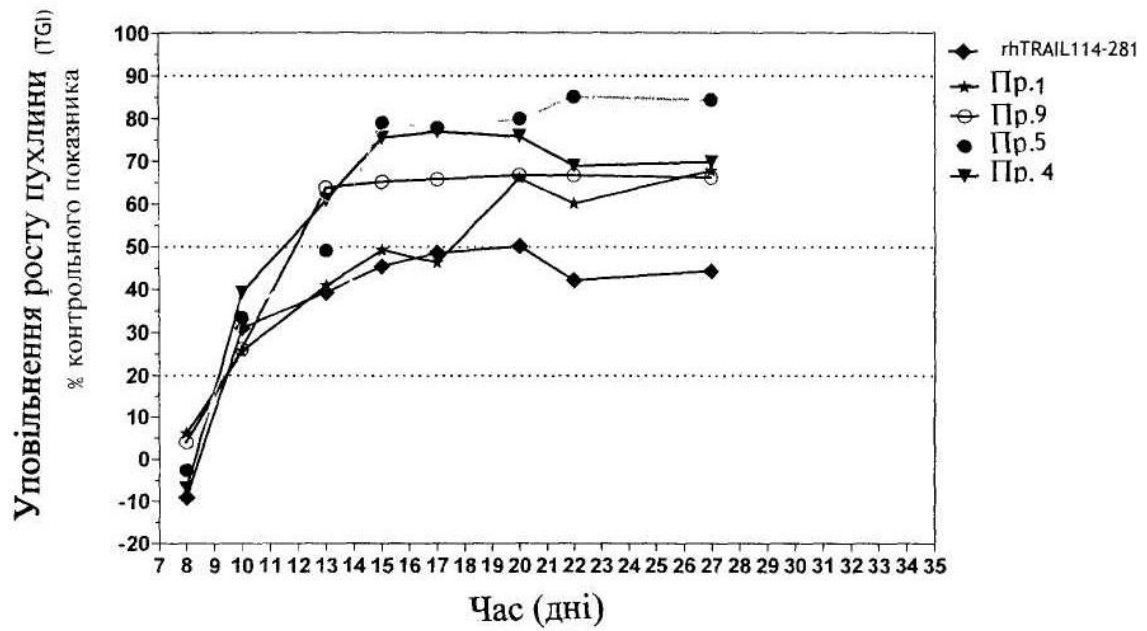
продовження
Фіг. 4



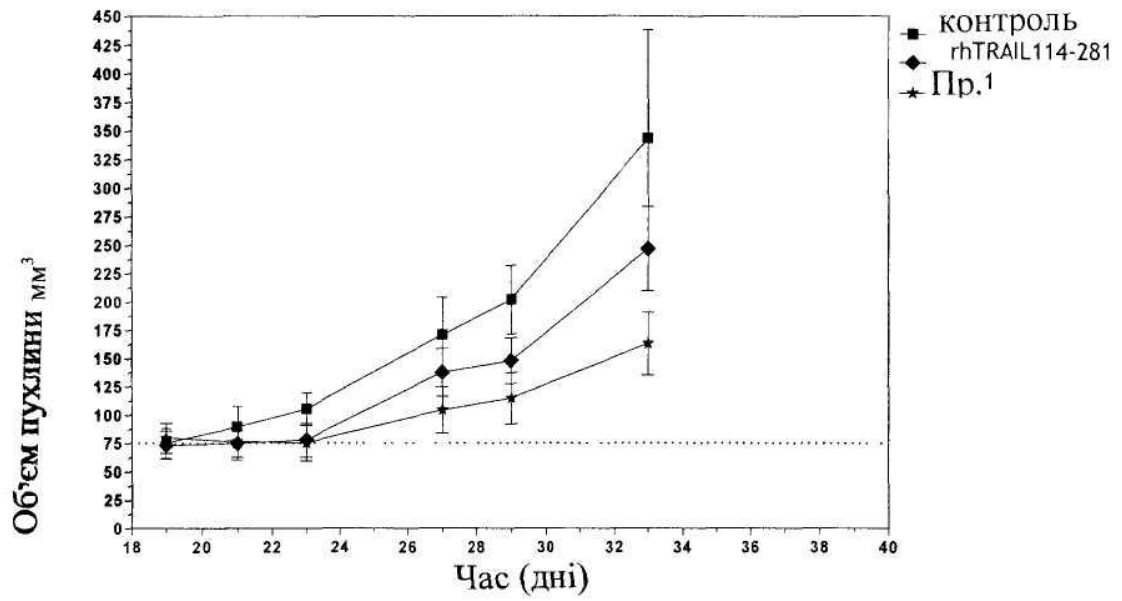
Пр. 14
продовження
Фіг. 4



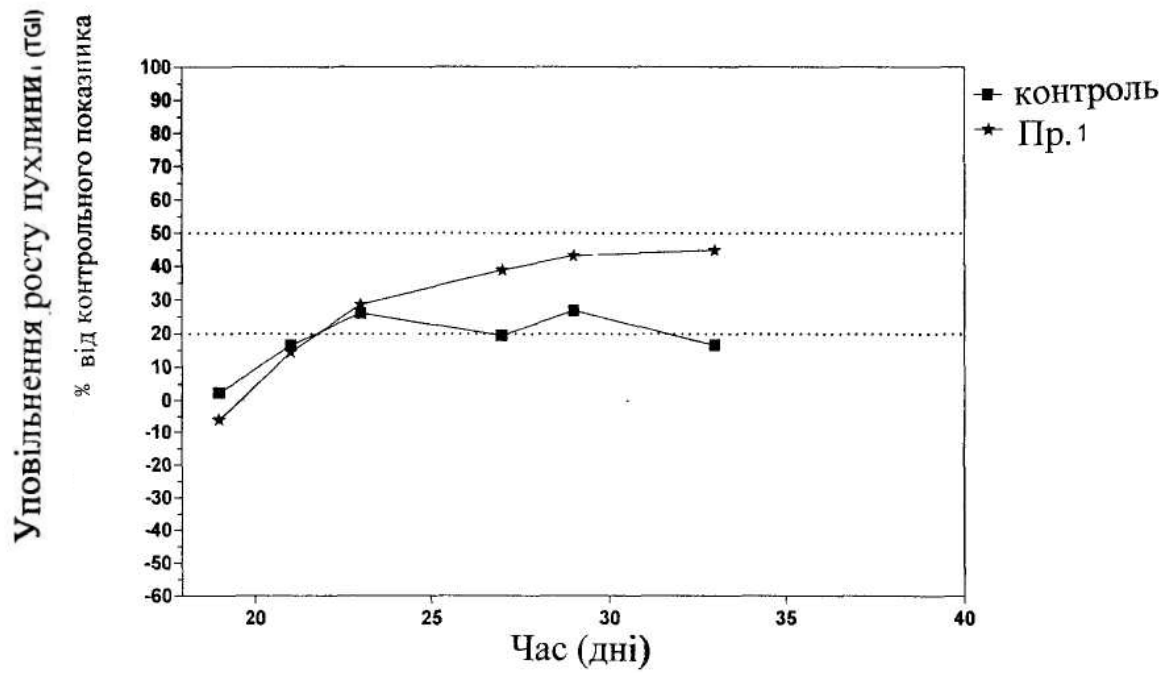
Фіг. 5



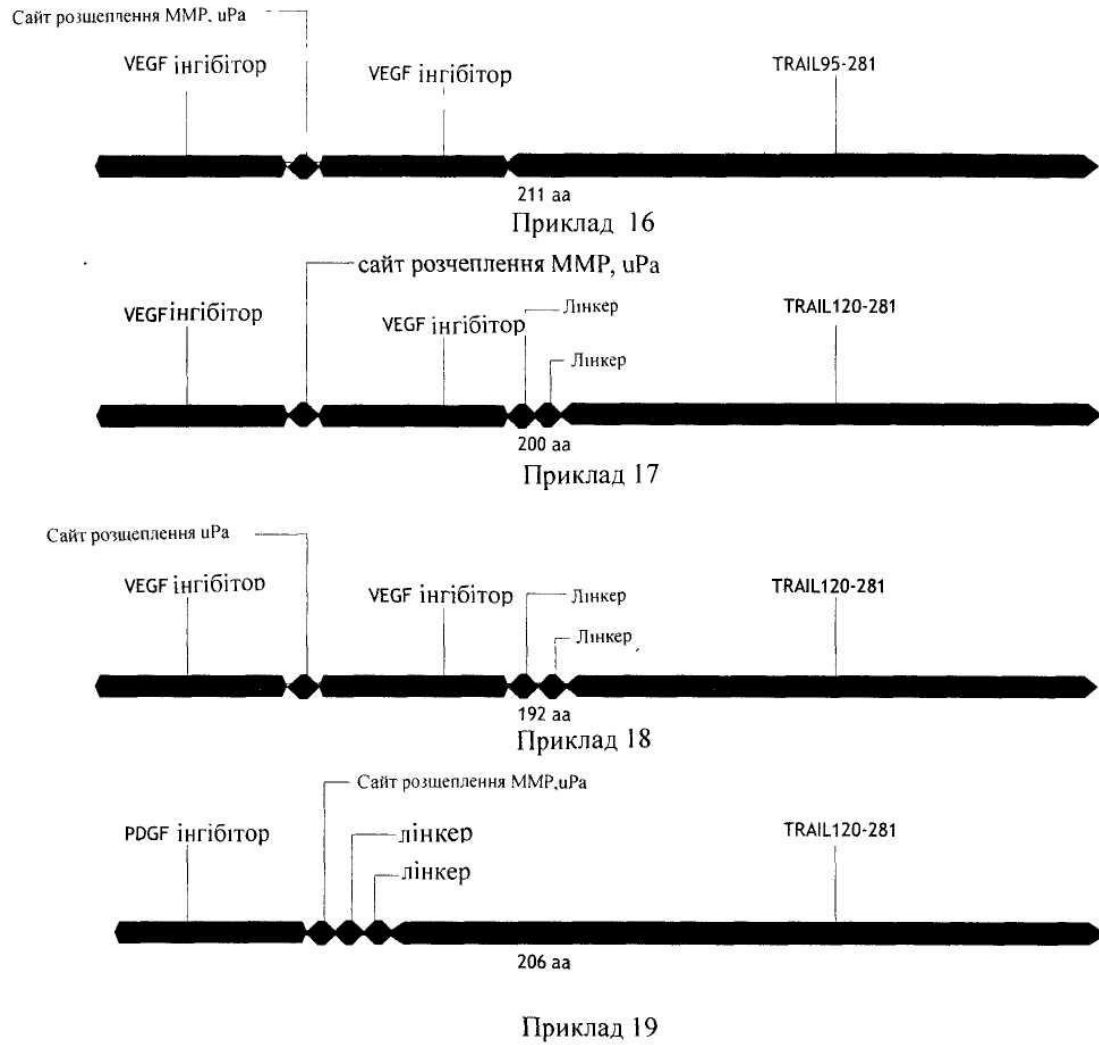
Фіг. 6



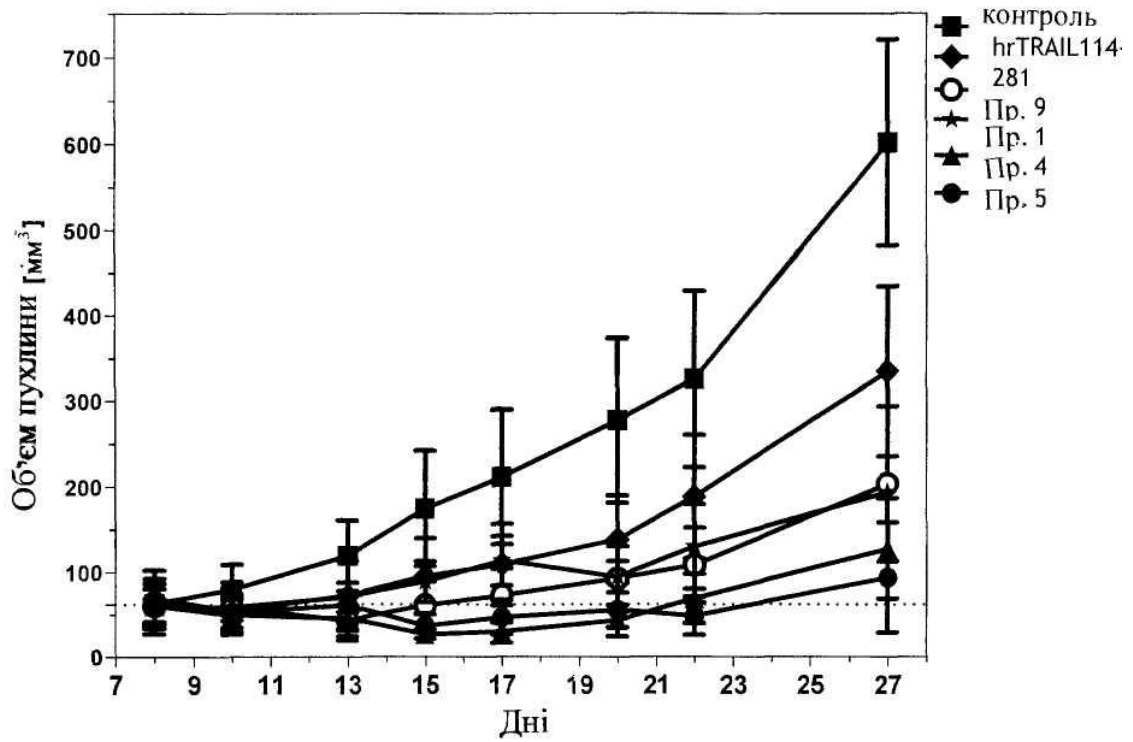
Фіг. 7



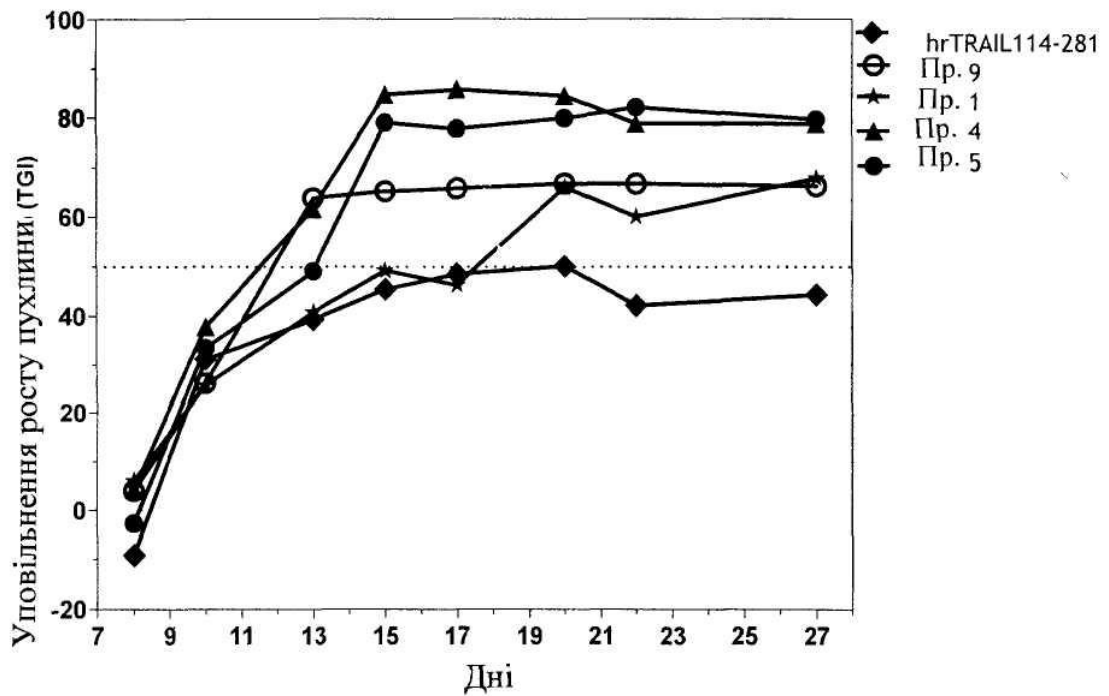
Фіг. 8



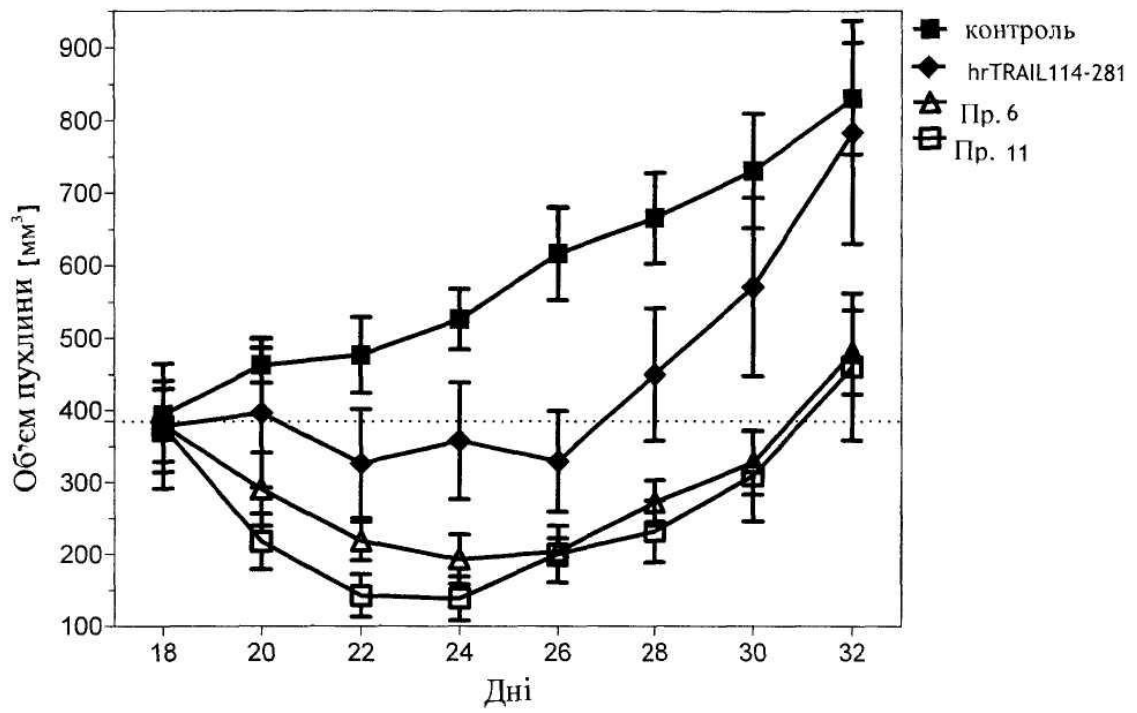
Фіг. 9



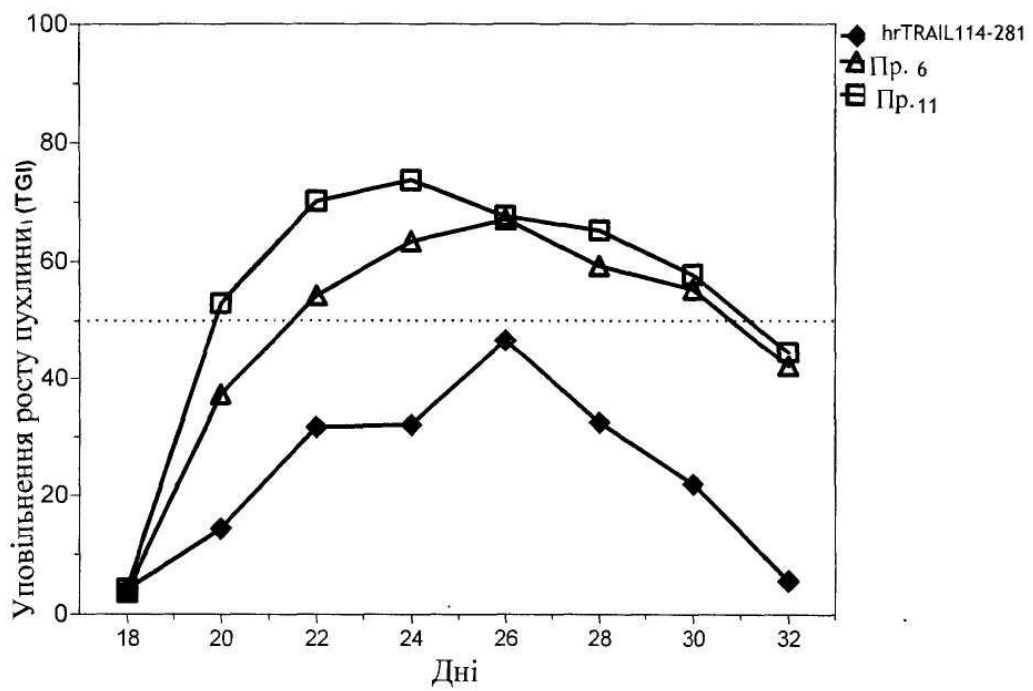
Фіг. 10



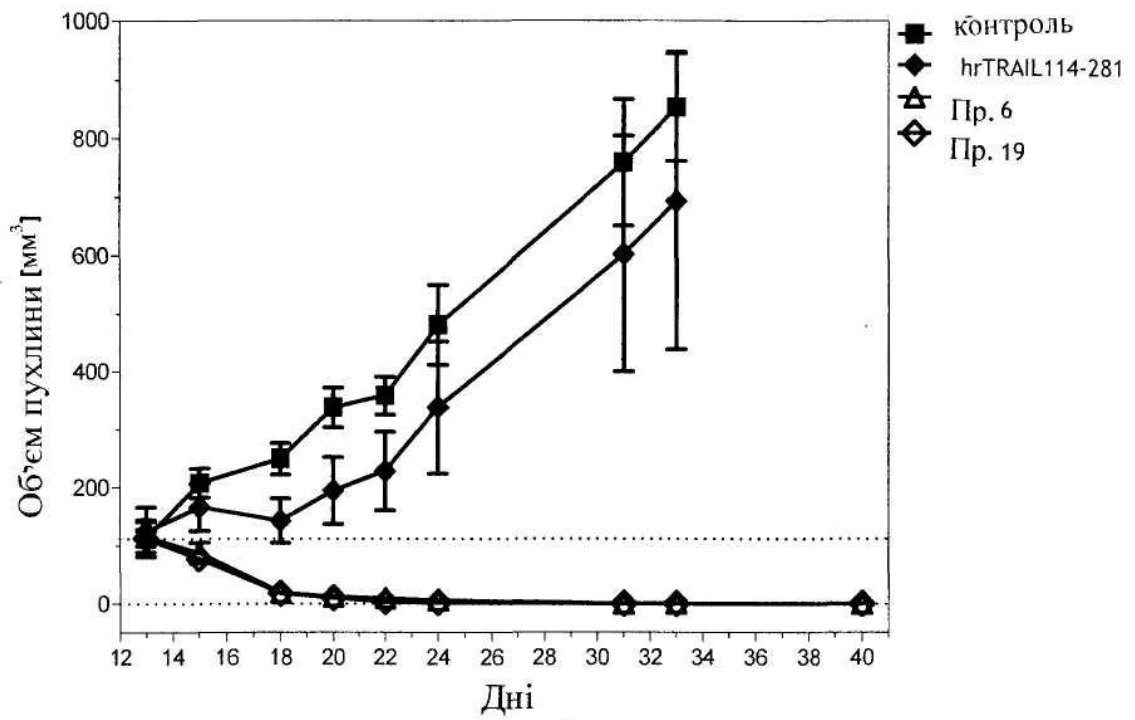
Фіг. 11



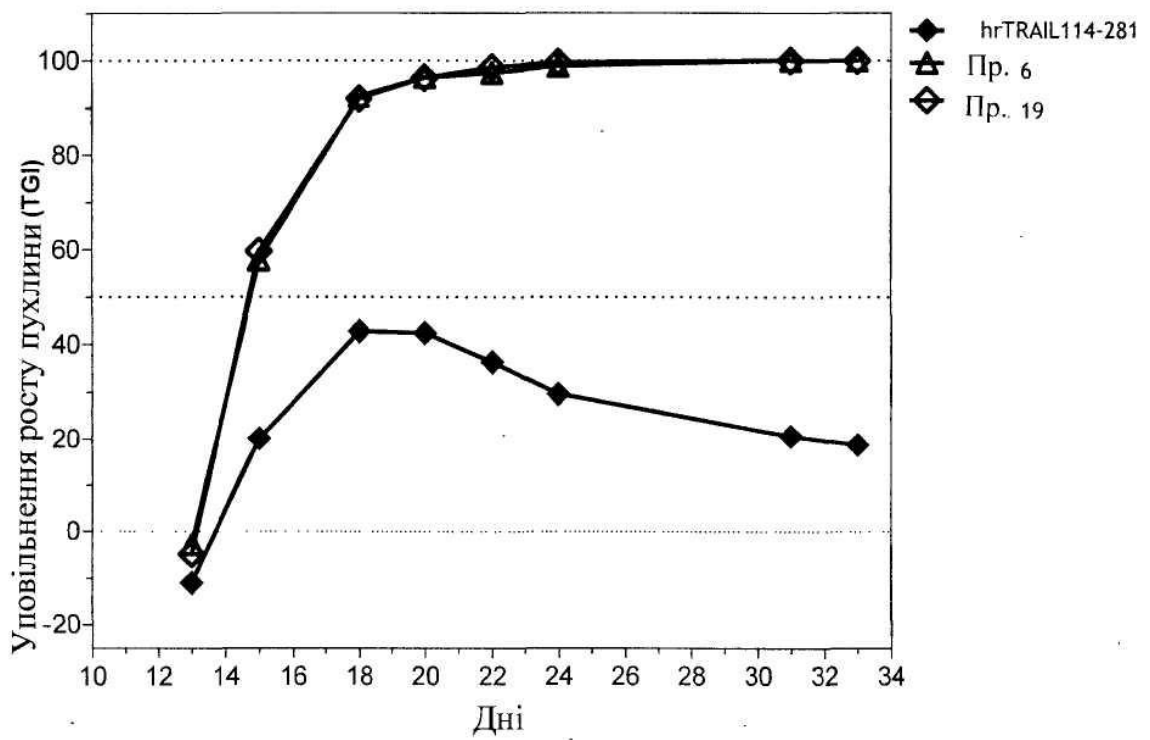
Фіг. 12



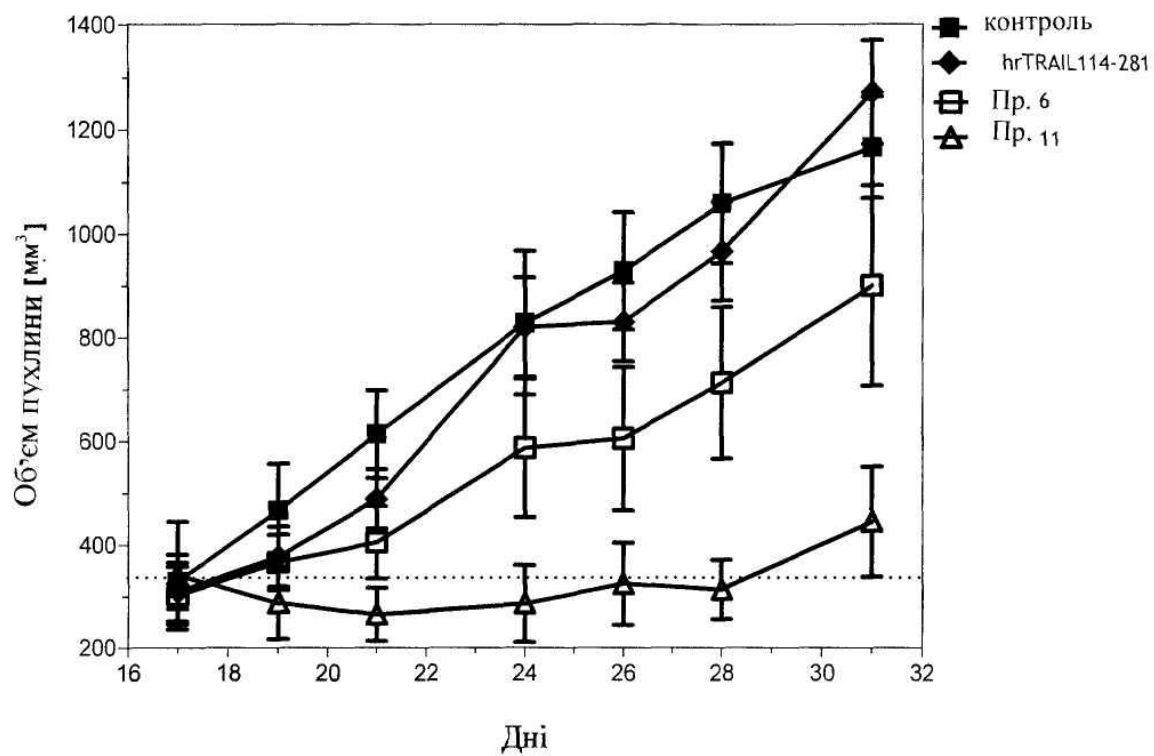
Фіг. 13



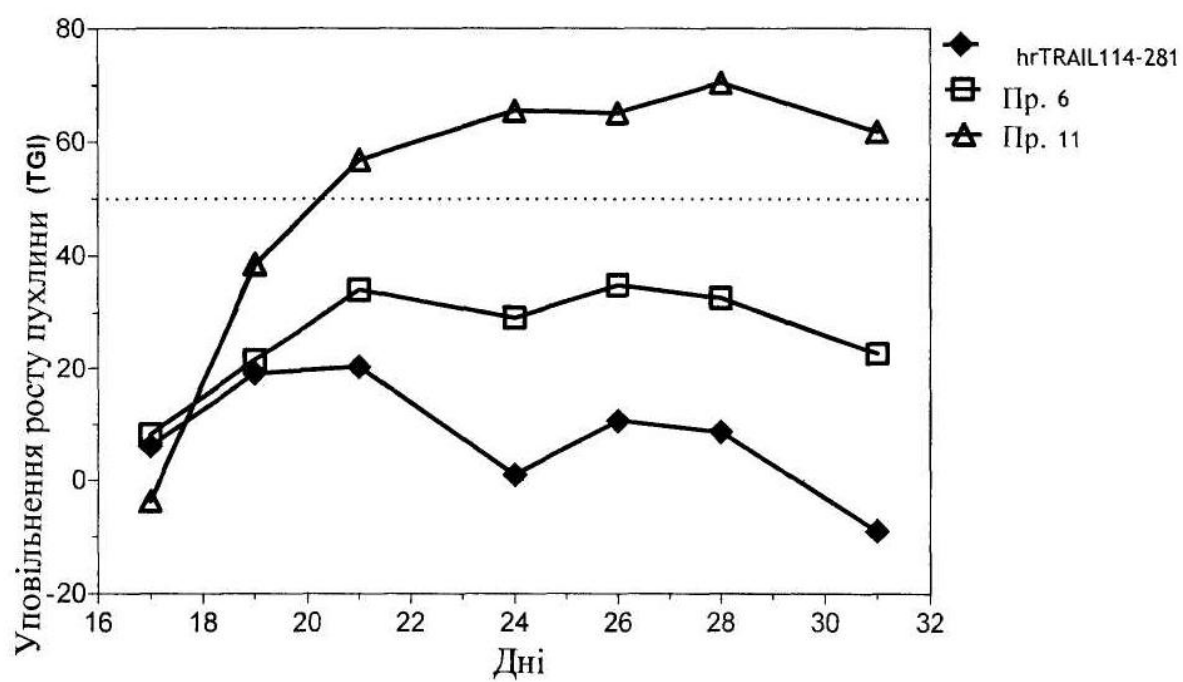
Фіг. 14



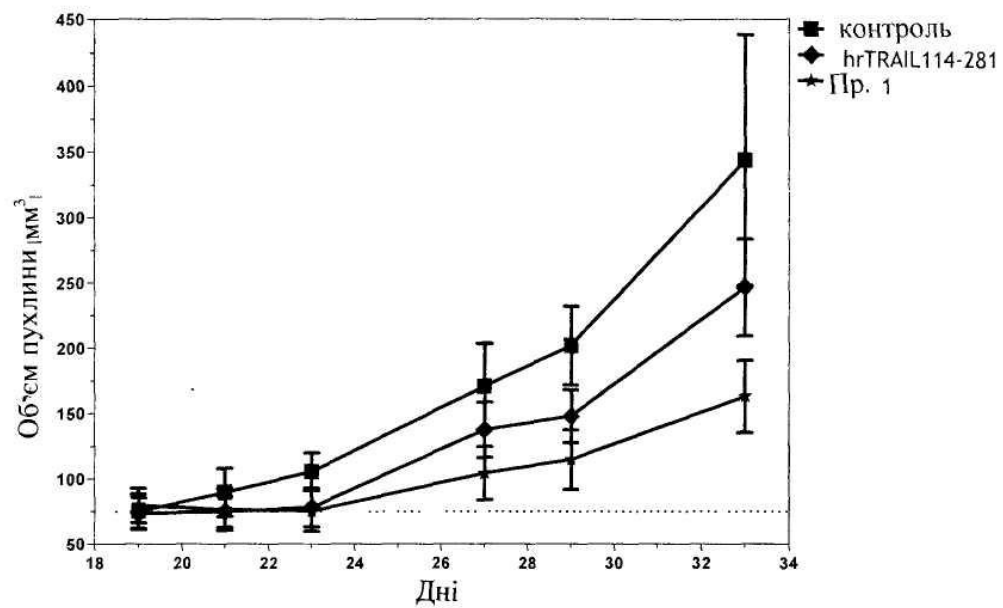
Фіг.15



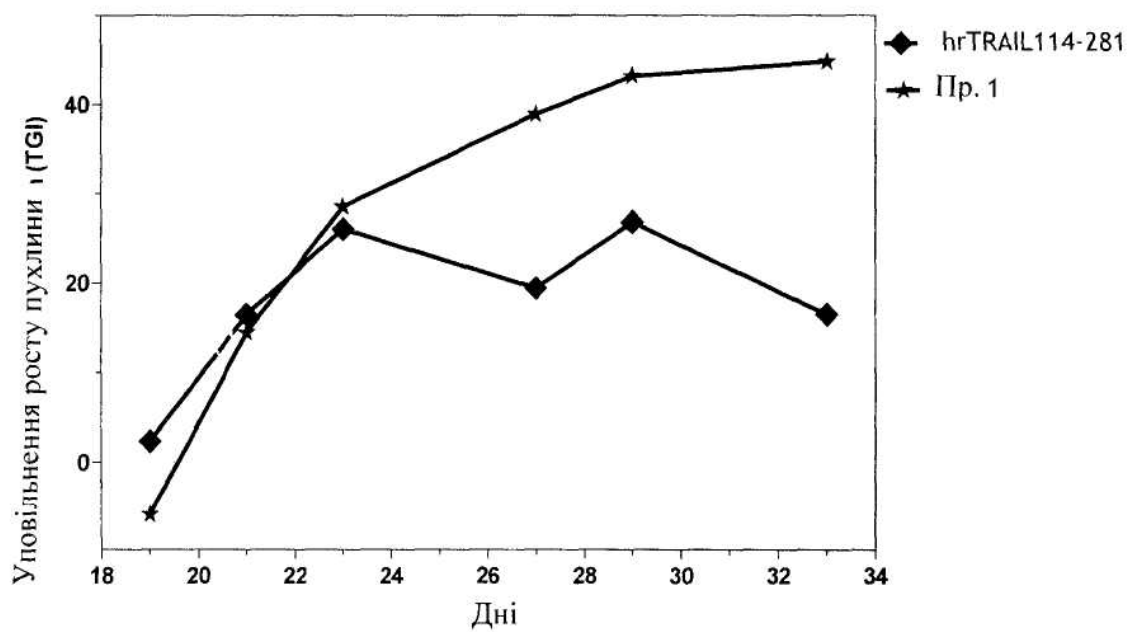
Фіг. 16



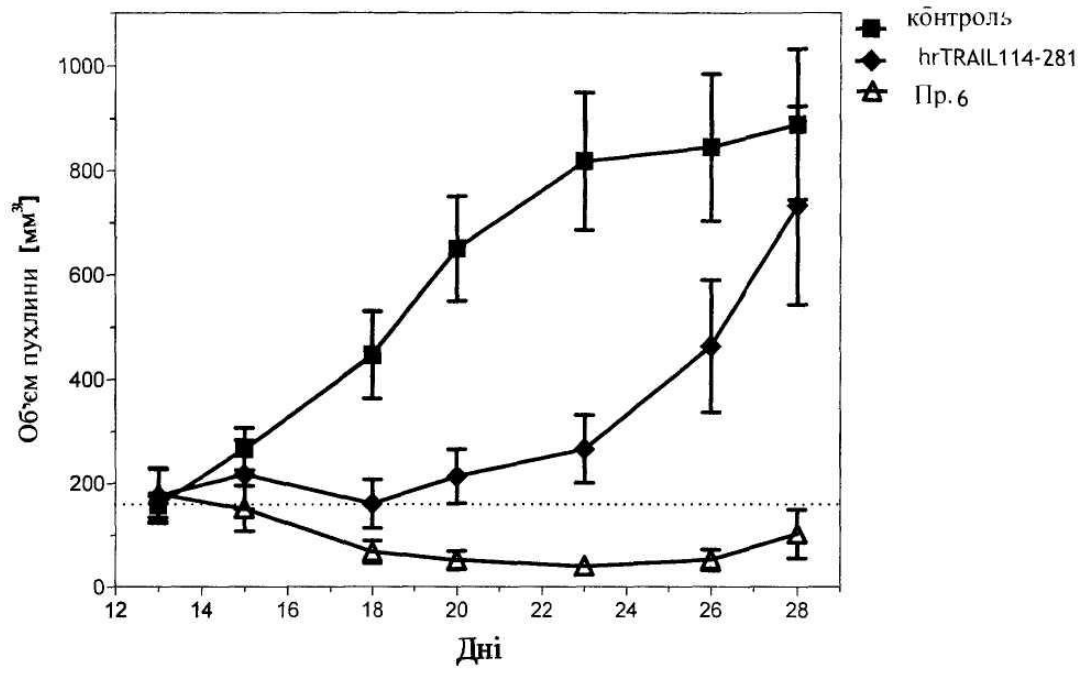
Фіг. 17



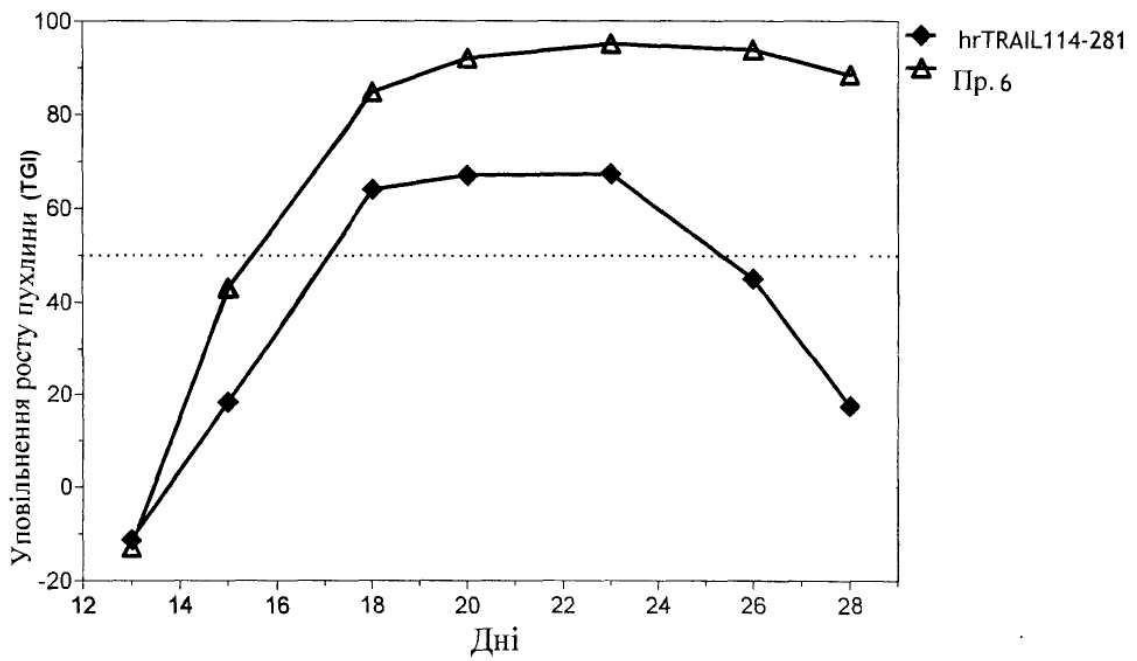
Фіг. 18



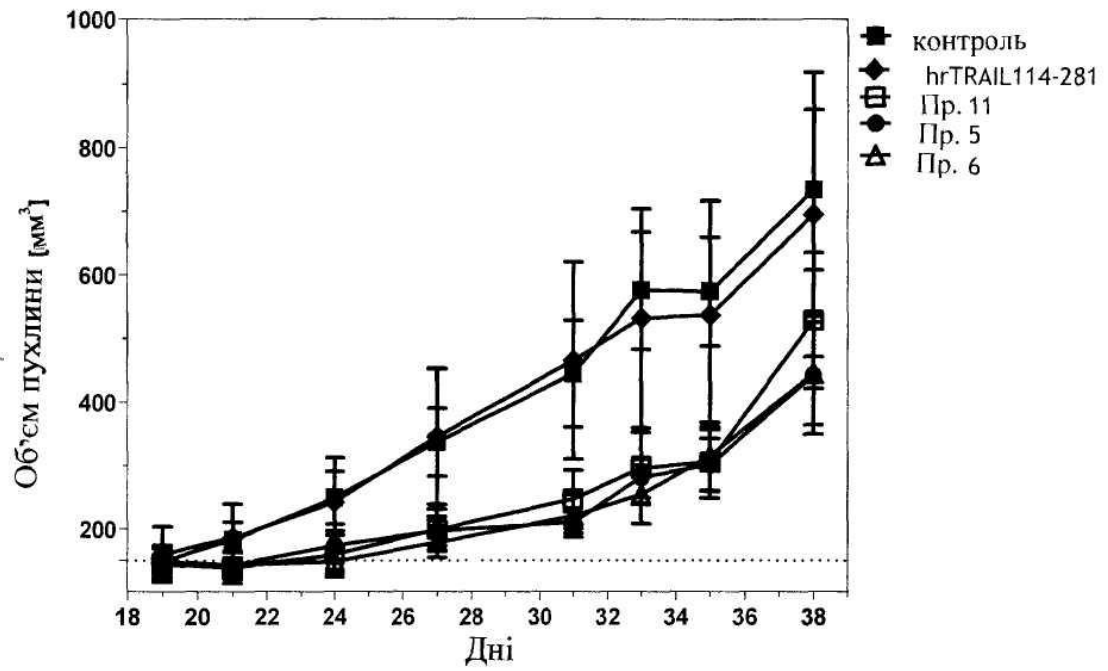
Фіг. 19



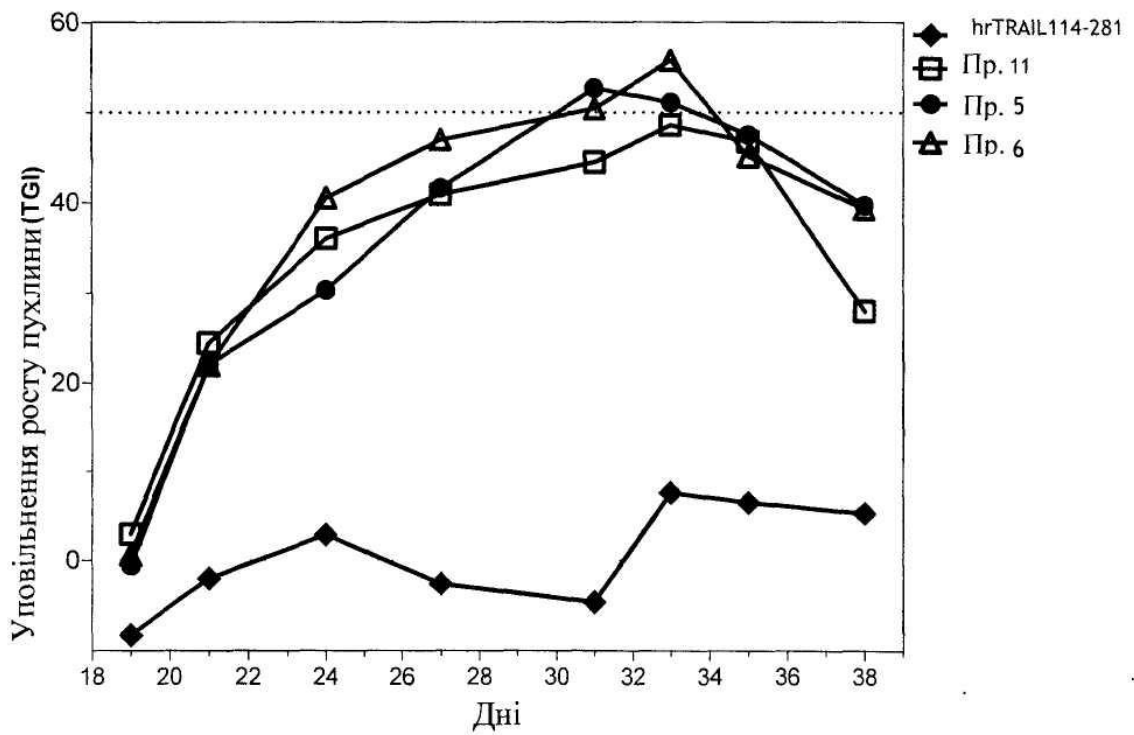
Фіг. 20



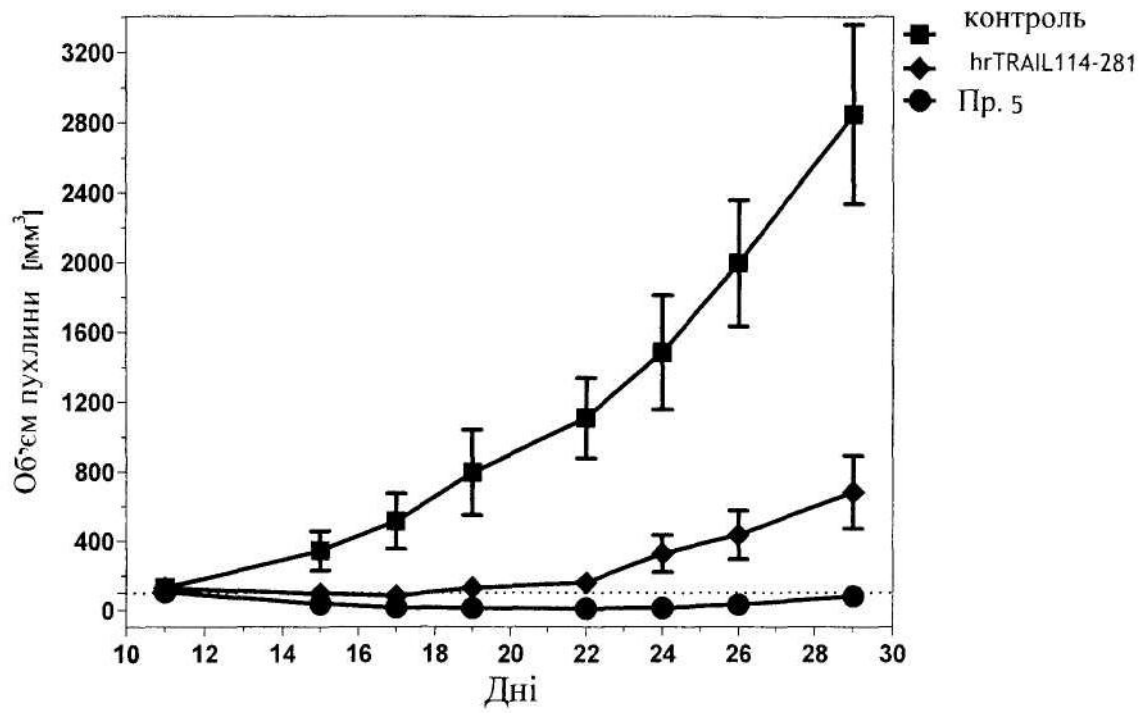
Фіг. 21



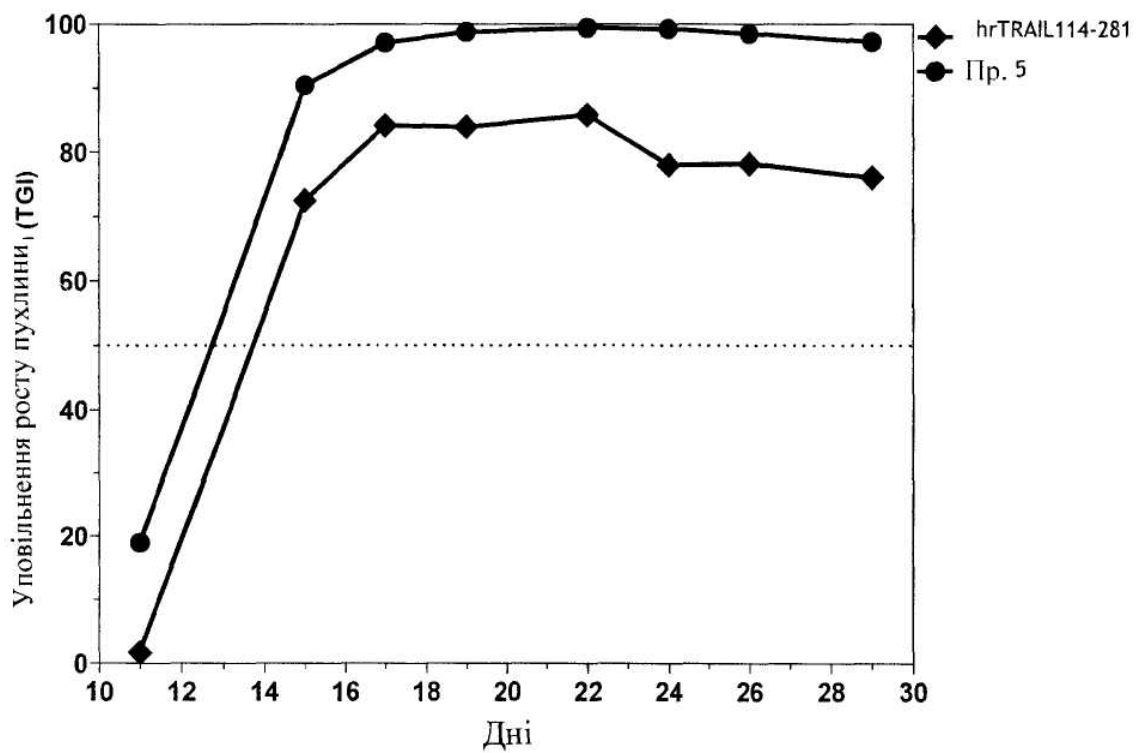
Фіг. 22



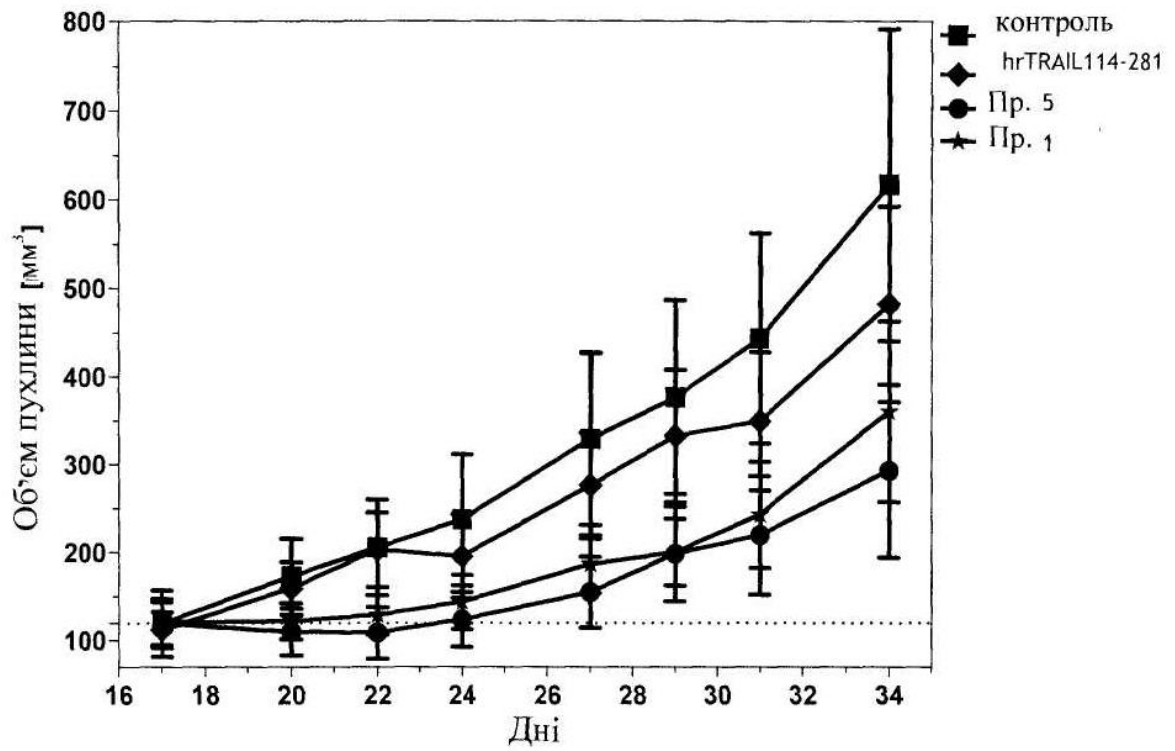
Фіг. 23



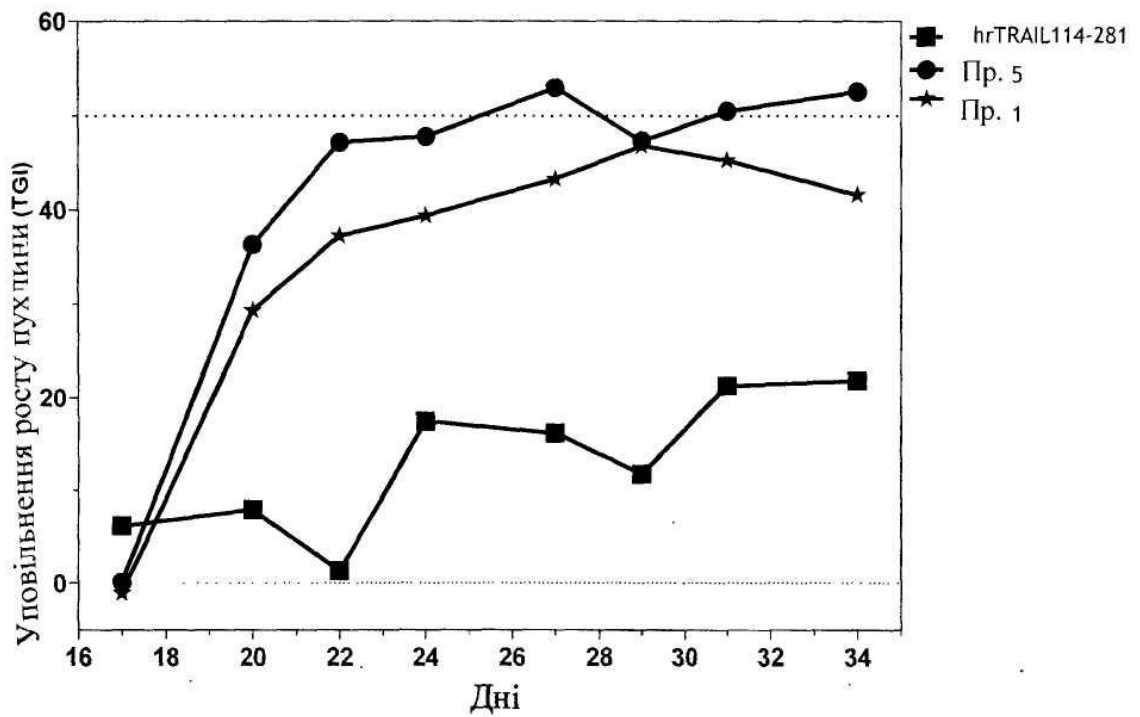
Фіг. 24



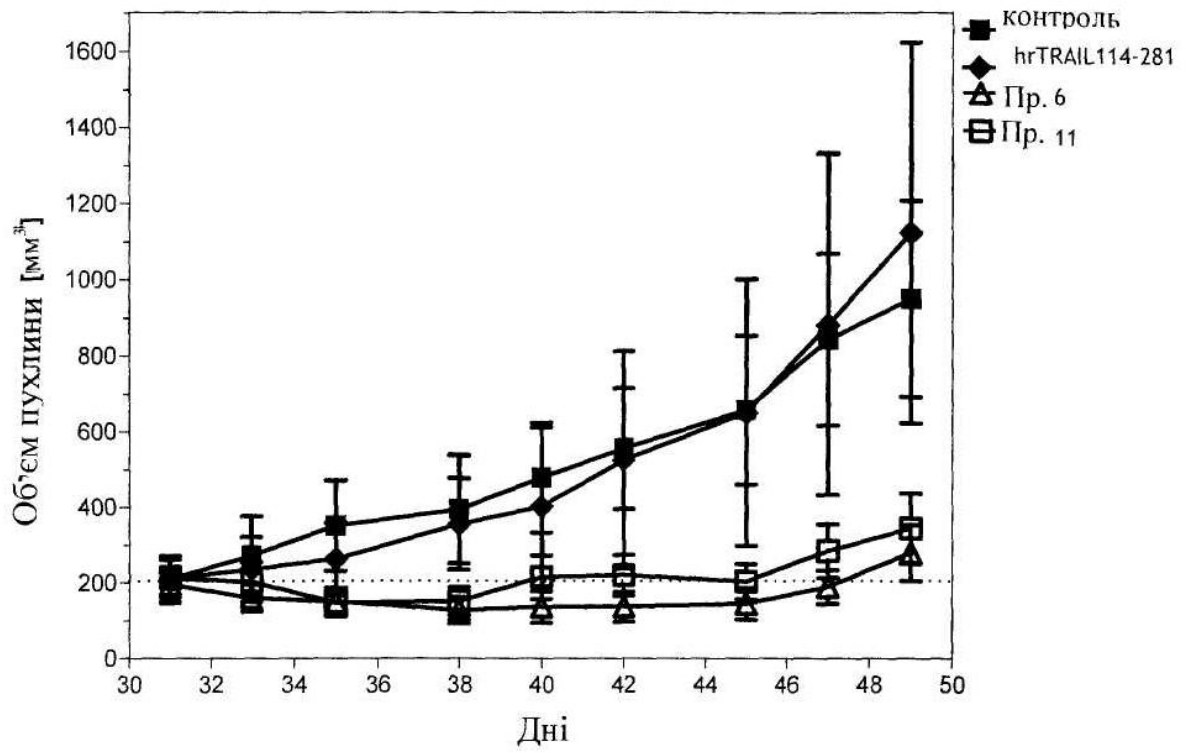
Фіг. 25



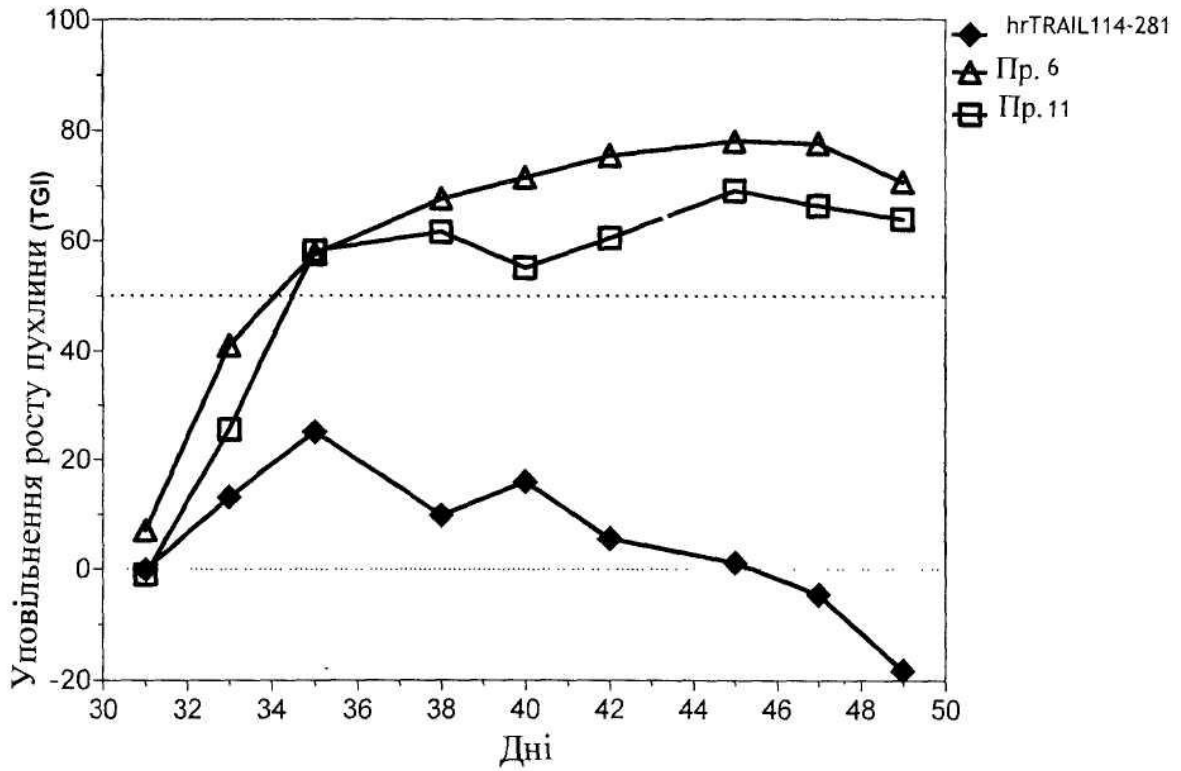
Фіг. 26



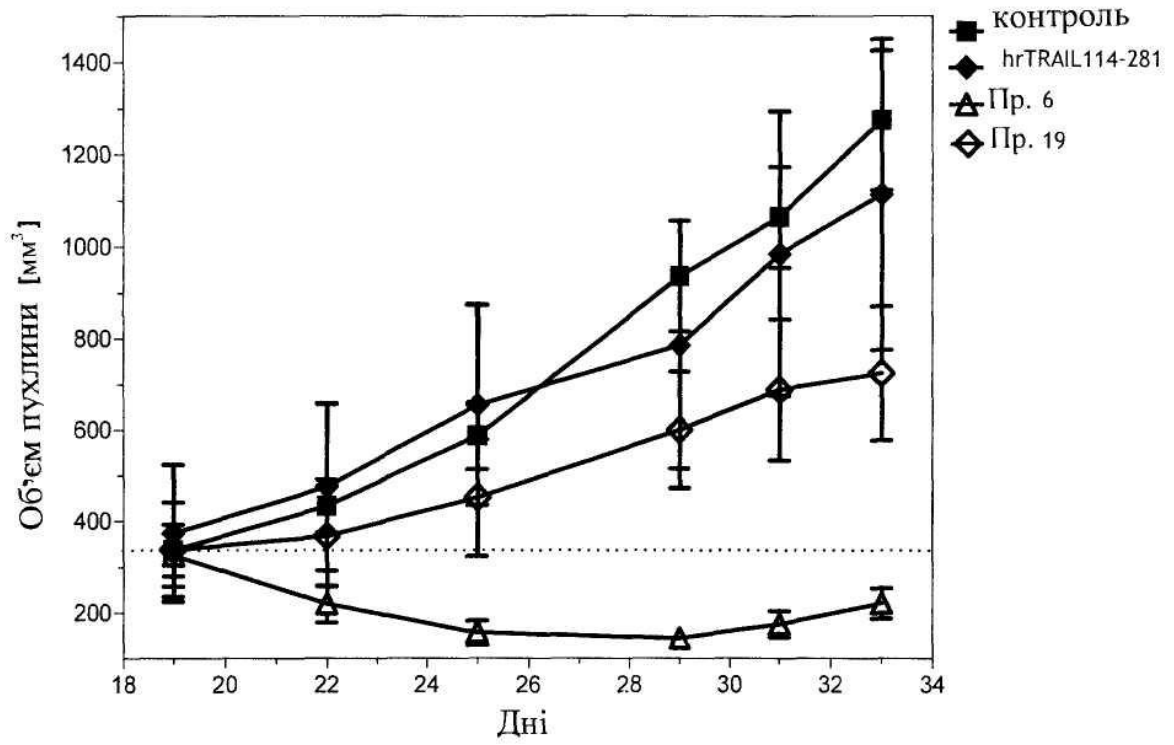
Фіг. 27



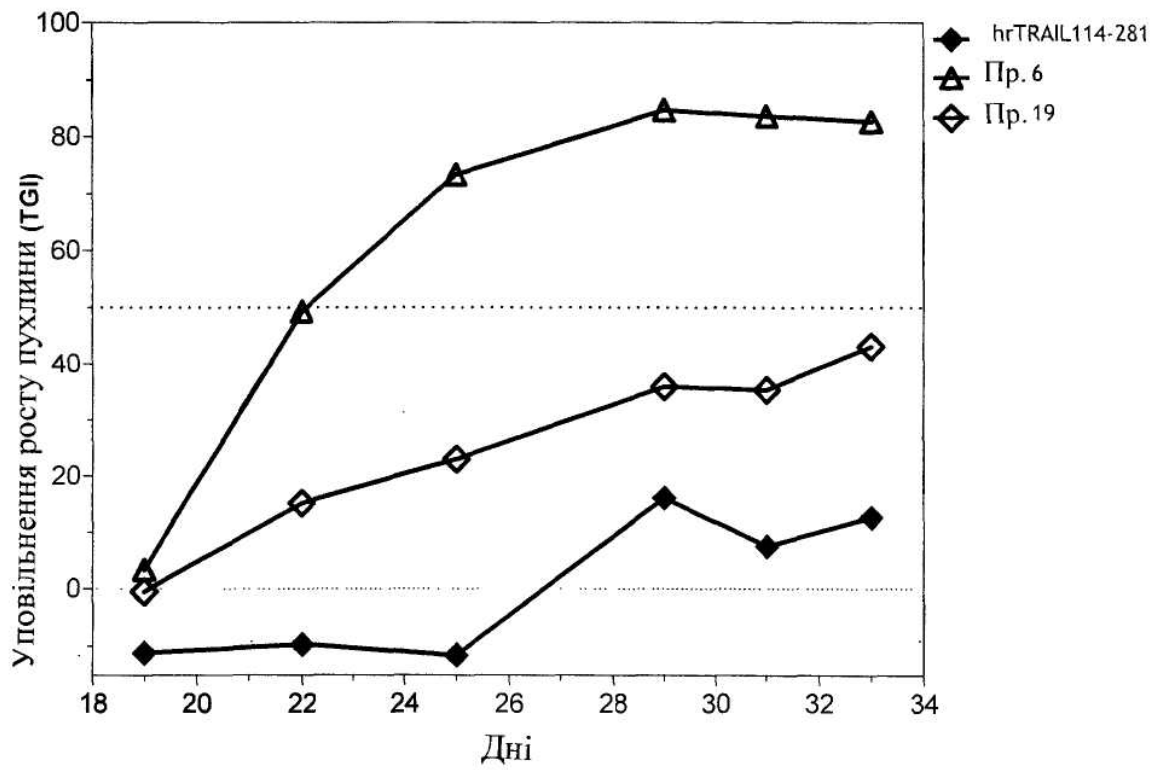
Фіг. 28



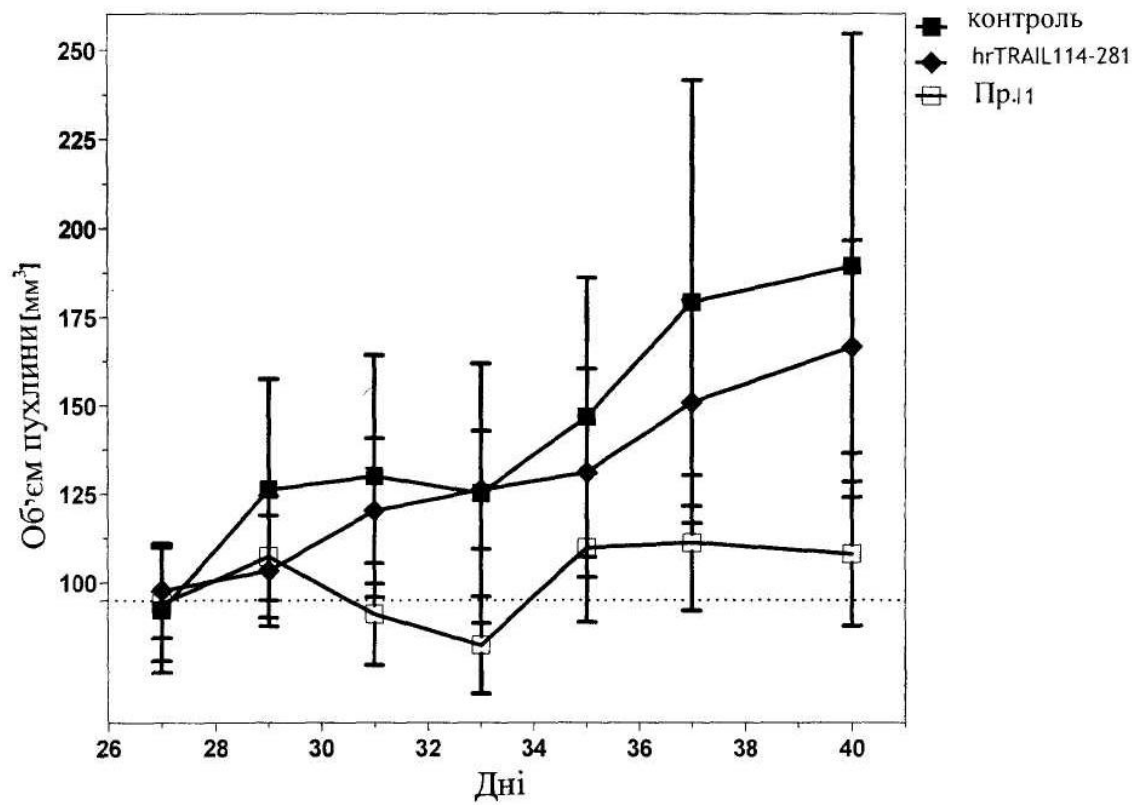
Фіг. 29



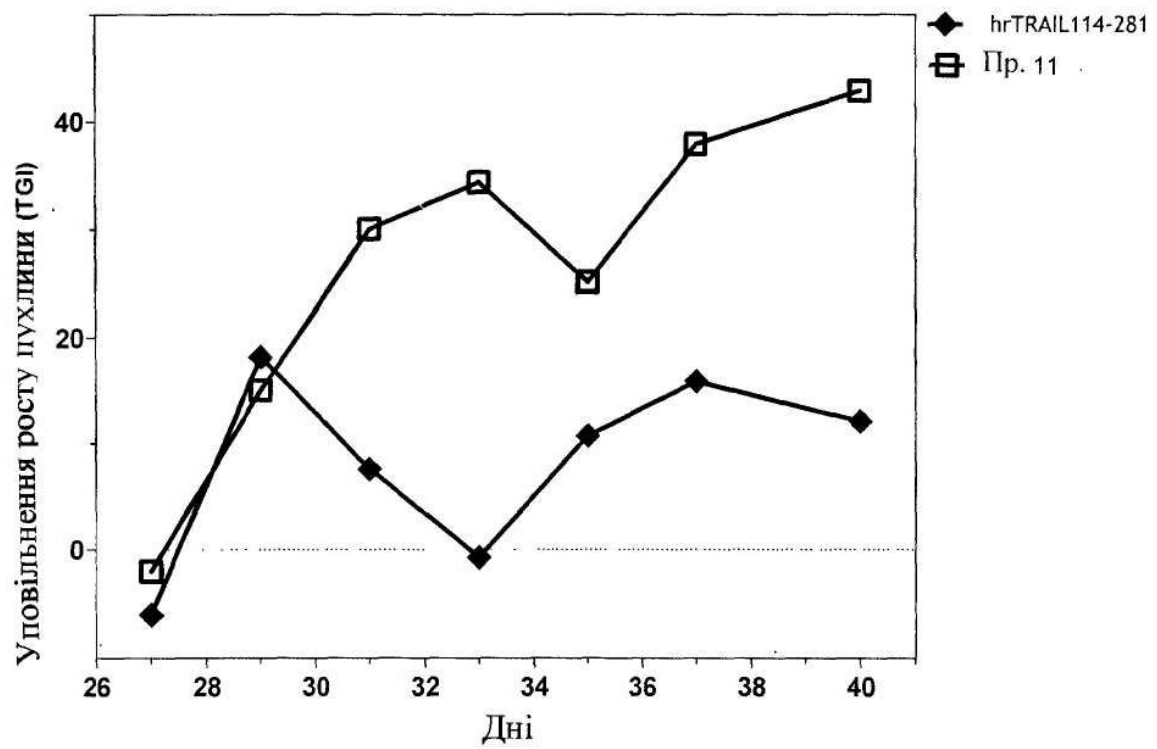
Фіг. 30



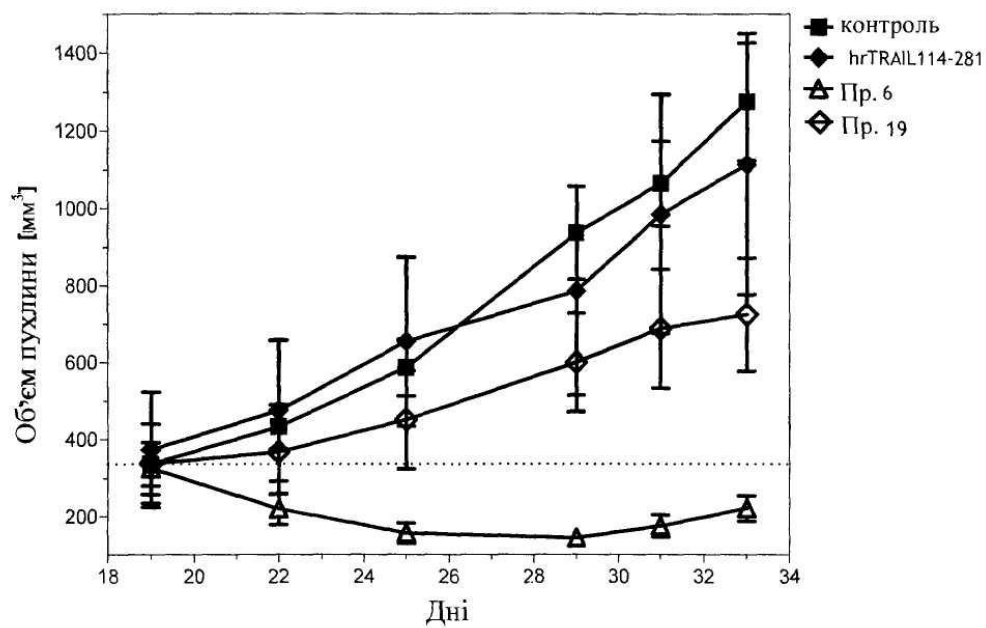
Фіг. 31



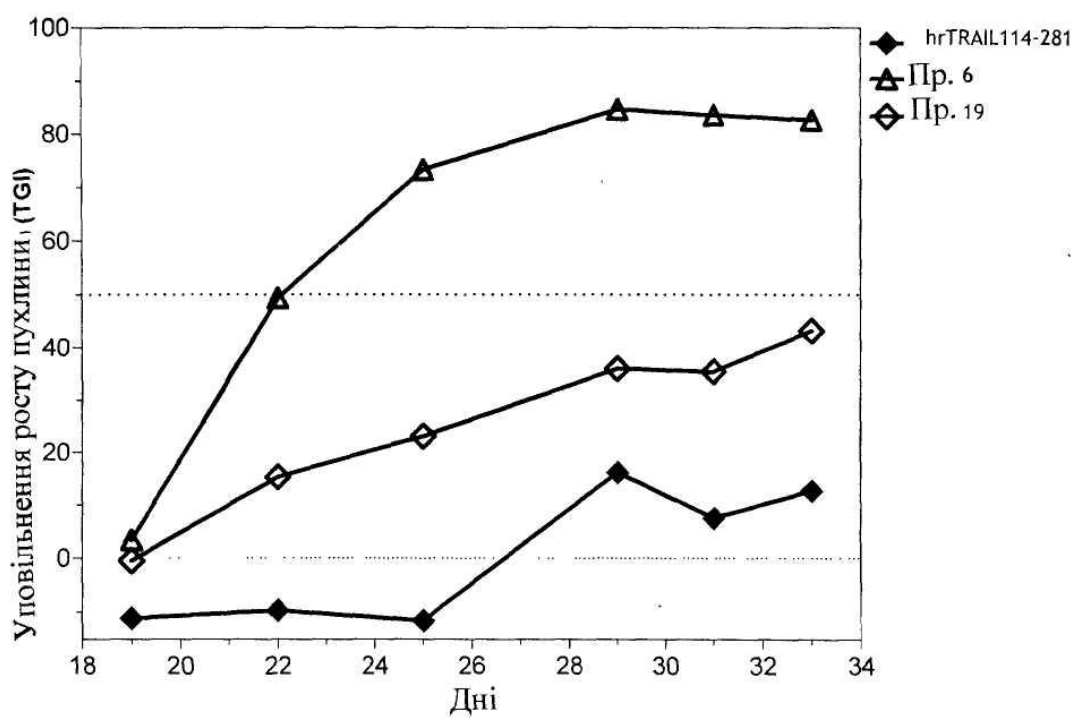
Фіг. 32



Фіг. 33



Фіг. 34



Фіг. 35

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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