



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120697** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2013 10947**
(22) Дата подання заявки: **10.02.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.01.2020**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10-2011-0012983**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **14.02.2011**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **KR**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.10.2013, Бюл.№ 20**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.01.2020, Бюл.№ 2**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/IB2012/000259, 10.02.2012**
(72) Винахідник(и):
**Лі Джей Мюн (KR),
Йун Джу Чун (KR),
Парк Санг Ву (KR),
Кім Джонг Сун (KR)**
(73) Власник(и):
**НКМАКС Ко., Лтд.,
172, Dolma-ro, Bundang-gu, Seongnam-si,
Gyeonggi-do, Republic of Korea (KR)**
(74) Представник:
**Кістерський Арсеній Леонідович, реєстр.
№177**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Tajima F. et al. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. Leukemia, 1996, Vol. 10, No. 3, P. 478-482
WO 2006/110577 A2, 19.10.2006
US 2007/0110713 A1, 17.05.2007
WO 03082206 A2, 09.10.2003
US 2010136052 A1, 03.06.2010
US 2005203010 A1, 15.09.2005
KR 10-0565764 B1, 22.03.2006
KR 10-1989-0009978 A, 05.08.1989
Claus Maren et al. Evaluation of human natural killer cell activities in whole blood. Current protocols in immunology, 2010, Vol. 7.39, Supl. 91, P. 7.39.1-7.39.17
Lindgren A. et al. Impaired IFN-gamma production after stimulation with bacterial components by natural killer cells from gastric cancer patients. Experimental cell research, 2011, Vol. 317, No. 6, P. 849-858
Parihar R. et al. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. Journal of clinical investigation, 2002, Vol. 110, No. 7, P. 983-992
Kwang-Ho Pyun et al. Studies on the development of screening techniques for cell growth regulating factors: Development of Screening systems for immune cell growth regulators and investigations for their actions. Korea research institute of bioscience and biotechnology, 1994, No. 8, P. 1-75
Kane K. L. et al. Determination of natural killer cell function by flow cytometry. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 1996, Vol. 3, No.3, P. 295-300
Man M. F. et al. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. Journal of leukocyte biology, 2008, Vol. 83, No. 3, P. 774-784
Takeda K. et al. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by Lactobacillus casei Shirota. Clinical and experimental immunology, 2006, Vol. 146, P. 109-115
Lee Sh-J. et al. Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. The journal of immunology, 2001, Vol. 167, No. 1, P. 497-504
Takeuchi H. et al. Prognostic significance of natural killer cell activity in patients with gastric carcinoma: a multivariate analysis. The American journal of gastroenterology, 2001, Vol. 96, No. 2, P. 574-578

(54) СПОСІБ ВИМІРУ АКТИВНОСТІ ПРИРОДНИХ КЛІТИН-КІЛЕРІВ (НК) У ЗРАЗКУ ЦІЛЬНОЇ КРОВІ

(57) Реферат:

UA 120697 C2

Винахід стосується способу виміру активності природних клітин-кілерів (NK), який включає: стимулювання NK-клітин у зразку цільної крові за допомогою інкубування зразка цільної крові засобом, що містить щонайменше один стимулюючий цитокін, вибраний з групи, що складається з інтерлейкіну 2, інтерлейкіну 15 та інтерлейкіну 18, таким чином штучно активуючи NK-клітини до вироблення і секреції секретуючих NK-клітинами цитокінів; і вимір кількості секретуючих NK-клітинами цитокінів, секретованих у зразку цільної крові, та застосування кількості як міри для оцінки активності NK-клітин; причому секретуючі NK-клітинами цитокіни містять інтерферон-гамма (IFN- γ), фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α) або обидва з них; і причому, коли засіб містить інтерлейкін 18, засіб не містить інтерлейкін 12.

Посилання на споріднену заявку

Дана заявка просить пріоритет за заявкою на видачу патенту Кореї № 2011-0012983, поданої 14 лютого 2011 року, розкриття якої включено в даний документ за допомогою посилання в повному її обсязі.

5 Область техніки

Даний винахід відноситься до способу діагностики злоякісної пухлини й набору для діагностики шляхом виміру активності NK-клітин.

Рівень техніки

10 Відомо, що природні клітини-кілери (NK) беруть участь в уродженому імунитеті, знищуючи патогени й злоякісні клітини й секретуючи інтерферон гама (IFN- γ), фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α), макрофагальний білок запалення 1 β (MIP-1 β) та інші молекули, опосередковуючи придбаний імунитет. При зустрічі NK-клітин з іншими клітинами NK-клітини задіють механізм, відповідно до якого, якщо відсутні молекули MHC 1 класу, як у випадку злоякісних клітин, або форма молекул класу MHC є нетиповою, як у випадку інфікованих вірусами клітин, то їх молекули головного комплексу гістосумісності (MHC) посиляють сигнали 15 NK-клітинам атакувати ці аномальні клітини за допомогою молекулярних дій. Однак, повідомлялося, що оскільки NK-клітини характеризуються порушеннями функцій і здатностями до диференціації при різних типах злоякісної пухлини, то активність NK-клітин тісно пов'язана з виживанням злоякісних клітин. Таким чином, проводиться інтенсивне дослідження з метою підвищення кількості або активності NK-клітин для імунотерапії злоякісної пухлини. 20

Що стосується способів діагностики злоякісної пухлини то, вони переважно передбачають виявлення наявності злоякісної пухлини з графічних зображень, які отримуються за допомогою комп'ютерної томографії (КТ), магнітно-резонансної томографії (МРТ) або рентгенограм. Однак, оскільки ці тести звичайно проводять тільки у випадку, якщо пацієнт сильно потребує виконання 25 тестів, через біль або незручність, і їх здійснюють тільки на певних тканинах, то наявність злоякісної пухлини може бути упущене з виду. Був розроблений спосіб визначення ризику захворювання злоякісною пухлиною за допомогою аналізу крові, але його застосування як спосіб діагностики злоякісної пухлини є обмеженим. Це пов'язане з тим, що в пацієнта може виявитися позитивний результат на злоякісну пухлину при наявності скоріше етіологічного фактору у відповідному органі, а не самої злоякісної пухлини, оскільки спосіб здійснюють за 30 допомогою пухлинних маркерів у крові, як наприклад, для злоякісної пухлини передміхурової залози, колоректальної злоякісної пухлини, злоякісної пухлини яєчників, злоякісної пухлини підшлункової залози або злоякісної пухлини печінки. Були також вжиті спроби діагностики злоякісної пухлини за допомогою антитіл, але такі спроби обмежені певними типами злоякісних пухлин. 35

Відповідно, як і раніше існує необхідність у нових способах діагностики різних типів злоякісних пухлин.

Сутність винаходу

40 Таким чином, даний винахід відноситься до способу, який може застосовуватися для діагностики й оцінки злоякісної пухлини, а також до застосовуваних у такому способі наборів і реактивів.

Відповідно з одним аспектом даний винахід відноситься до способу виміру активності NK-клітин, при цьому спосіб передбачає стимулювання NK-клітин у зразку крові, таким чином штучно активуючи NK-клітини до вироблення секретуючих NK-клітинами цитокінів, і вимір 45 кількості секретуючих NK-клітинами цитокінів у зразку крові.

Відповідно до певних необмежуючих варіантів здійснення зразок крові може являти собою зразок цільної крові, мононуклеарних клітин периферичної крові (МКПК) або NK-клітин.

У відповідності з наступними варіантами здійснення стимулювання NK-клітин може бути здійснене шляхом інкубування зразка крові щонайменше з одним стимулюючим цитокіном, 50 включаючи інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 і інтерлейкін 18 або їх комбінації, або шляхом інкубування зразка крові з ліпополісахаридами (ЛПС) або поліінозиною:поліцитидиловою кислотою (полі І:Ц).

Відповідно до певних варіантів здійснення секретуючі NK-клітинами цитокіни можуть містити інтерферон-гама (IFN- γ), фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α) або макрофагальний білок 55 запалення 1 β (MIP-1 β).

У відповідності з наступними необмежуючими варіантами здійснення способу макрофагальний білок запалення 1 β (MIP-1 β) може бути використаний у якості контрольної групи для порівняння активації NK-клітин у хворого активацією в здоровій людини.

60 Крім того, відповідно до певних варіантів здійснення спосіб може бути виконаний із застосуванням щонайменше одного стимулюючого цитокіну, злитого зі стабілізуючим пептидом.

Наприклад, і без обмеження, стабілізуючий пептид може являти собою пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів. Відповідно до таких варіантів здійснення стабілізуючі пептиди можуть містити амінокислотні залишки 103-115 (SEQ ID NO: 22), амінокислотні залишки 114-126 (SEQ ID NO: 23), амінокислотні залишки 119-140 (SEQ ID NO: 24) або амінокислотні залишки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотні залишки 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну (SEQ ID NO: 27), амінокислотні залишки 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну (SEQ ID NO: 29) або амінокислотні залишки 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену сіморетину (SEQ ID NO: 29).

У відповідності з наступними варіантами здійснення етап стимулювання НК-клітин у зразку крові, таким чином штучно активуючи НК-клітини до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів, виконують у середовищі, яка містить білок-носії, наприклад, сироватковий альбумін.

Описаний спосіб є особливо придатним для визначення ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини. Відповідно до таких варіантів здійснення зменшення кількості секретуючих НК-клітинами цитокінів у суб'єктів у порівнянні з рівнями в здорових індивідуумів є показником ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.

Відповідно до додаткового аспекту даний винахід відноситься до набору для виміру активності НК-клітин. Набір буде включати засіб для стимулювання НК-клітин у зразку крові, таким чином штучно активуючи НК-клітини до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів. Крім того, набір може бути придатний для здійснення описаного вище способу, який передбачає визначення ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.

У відповідності з наступними необмежуваними варіантами здійснення описаного набору секретуючий НК-клітиною цитокін може являти собою інтерферон-гама (IFN- γ) або фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α).

У відповідності з наступним варіантом здійснення засіб для стимуляції НК-клітин у зразку крові й штучної активації НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів може містити щонайменше один стимулюючий цитокін, ЛПС або полі І:Ц, при цьому щонайменше один стимулюючий цитокін включає один або декілька з інтерлейкіну 2, інтерлейкіну 12, інтерлейкіну 15 і інтерлейкіну 18.

Відповідно до певних варіантів здійснення описаний набір може також містити одне або декілька з наступних: антитіло до IFN- γ , антитіло до TNF- α і антитіло до MIP-1 β . Без обмеження тим або іншим способом, набір може також додатково містити інструкції для порівняння кількості секретуючих НК-клітинами цитокінів у суб'єкта з рівнями в здорових індивідуумів, при цьому зменшення рівня секретуючих НК-клітинами цитокінів у суб'єкта є показником ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.

У відповідності з наступним аспектом даний винахід відноситься до химерного білка, який містить цитокін, зв'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, при цьому цитокін є або інтерлейкіном 2, або інтерлейкіном 12, або інтерлейкіном 15, або інтерлейкіном 18.

Відповідно до певних необмежуваних варіантів здійснення описаного химерного білка, пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів може містити амінокислотні залишки 103-115 (SEQ ID NO: 22), амінокислотні залишки 114-126 (SEQ ID NO: 23), амінокислотні залишки 119-140 (SEQ ID NO: 24) або амінокислотні залишки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотні залишки 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну (SEQ ID NO: 27), амінокислотні залишки 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну (SEQ ID NO: 29) або амінокислотні залишки 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену сіморетину (SEQ ID NO: 29).

Також даний винахід відноситься до, які містять описаний вище химерний білок, композицій.

Крім того, даний винахід відноситься до наборів для діагностики злоякісної пухлини, які містять або описані вище химерні білки, або описані вище композиції.

Описаний вище набір для діагностики злоякісної пухлини відповідно до певних необмежуваних варіантів здійснення може також включати щонайменше одне антитіло з наступних: антитіло до IFN- γ , антитіло до TNF- α і антитіло до MIP-1 β .

Даний винахід також відноситься до поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 80 % ідентичністю відносно амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 або SEQ ID NO: 10. Без обмеження, поліпептид може характеризуватися високою процентною ідентичністю, включаючи 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність відносно послідовностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 і SEQ ID NO: 10.

Даний винахід також відноситься до олігонуклеотидам, що кодують описані вище химерні білки й поліпептиди. Наприклад, даний винахід відноситься до олігонуклеотиду, що містить послідовність нуклеїнової кислоти щонайменше з 80 % ідентичністю відносно послідовності нуклеїнової кислоти SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 9 або її комплементарної послідовності. Такі олігонуклеотиди, без обмеження, можуть характеризуватися більш високою процентною ідентичністю, включаючи 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність, відносно послідовностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 або SEQ ID NO: 9 або їх комплементарним послідовностям.

Також даний винахід відноситься до, які містять описані вище олігонуклеотиди, векторів, а також до, які містять такі вектори або олігонуклеотиди, клітин-хазяїв.

Короткий опис креслень

Зазначені вище й інші об'єкти, ознаки й переваги даного винаходу стануть більш зрозумілі рядовим фахівцям у даній області техніки при докладному описі ілюстративних варіантів здійснення із прив'язкою до креслень, на яких:

Фіг. 1 являє собою схематичне зображення, що демонструє химерні продукти пептиду SP, злитого або з N-кінцем, або з C-кінцем цитокіну, включаючи hIL2, hIL12, hIL15 і hIL18.

Фіг. 2 являє собою фотознімок, який демонструє результати електрофорезу очищених химерних білків SP.

На Фіг. 3 показана активність штучно активованих у здорової людини НК-клітин за результатами аналізу кількості виробленого інтерферону- γ при стимулюванні НК-клітин окремим цитокіном (Фіг. 3A) або комбінованими цитокінами (Фіг. 3B-3D).

Фіг. 4 являє собою діаграму, яка демонструє цитокіни, секретовані зі штучно активованих НК-клітин, при оцінці за допомогою ІФА по типу сендвіча.

На Фіг. 5 показане порівняння білкової активності (A) і стабільності (B) між SP IL-2 і IL-2.

На Фіг. 6 показана активність НК-клітин у здорових людей і хворих злоякісним захворюванням, яких обробили окремо SP IL-2 (10 нг/мл) (умова A) і SP IL-2 (5 нг/мл) + IL-12 (5 нг/мл) (умова B).

Фіг. 7 являє собою діаграму, яка демонструє здатність НК-клітин секретувати інтерферон- γ у Т-клітин, НК-клітин, цільної крові й МКПК залежно від стимулюючої дії IL2.

Фіг. 8 являє собою діаграму, яка демонструє різницю в кількості секретуючого з НК-клітин у здорової людини інтерферону- γ при стимуляції ЛПС.

Фіг. 9 являє собою діаграму, яка демонструє різницю в здатності НК-клітин секретувати інтерферон- γ залежно від концентрацій IL12 і IL15 при обробці й відмінності композицій середовищ.

Фіг. 10 являє собою діаграму, що демонструє відмінність у кількості секретуючого інтерферону- γ залежно від стадії прогресування злоякісної пухлини.

На Фіг. 11 показані результати аналізу інтерферону- γ , виробленого НК-клітинами здорової людини, при стимуляції цитокінами в планшеті для ІФА.

На Фіг. 12 показані результати проточної цитометрії цільної крові від здорових людей при стимуляції цитокінами.

Докладний опис винаходу

Даний винахід відноситься до способу, набору й реактивам для діагностики ймовірності виникнення злоякісної пухлини за допомогою взаємозв'язку злоякісної пухлини з НК-клітинами.

Із цією метою пропонується спосіб виміру активності НК-клітин, який передбачає стимулювання НК-клітин у зразку крові, таким чином штучно активуючи НК-клітини до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів, і вимір кількості секретуючих НК-клітинами цитокінів у зразку крові.

Було виявлено, що виходячи зі спостережень, що активність НК-клітин є зниженою у хворих злоякісним захворюванням, ймовірність виникнення злоякісної пухлини можна переважно відслідковувати шляхом виміру активності НК-клітин. За допомогою описуваного в даному документі способу можна визначити нормально функціонують НК-клітини чи ні, як правило, подаючи штучний стимул НК-клітинам, і виміряти рівень активації НК-клітин шляхом визначення змін кількості присутніх у зразку крові секретуючих НК-клітинами цитокінів, що відрізняється від інших способів, які передбачають простий вимір від початку присутніх у зразку крові числа НК-клітин або кількості цитокінів. Наприклад, у традиційному способі виміру рівня активації НК-клітин аналіз по вивільненню ^{51}Cr застосовували в якості способу виміру спрямованої на мішені цитотоксичності. Однак при вимірі активності НК-клітин таким способом необхідно було застосовувати радіоактивний ізотоп, а вимір і аналіз є скрутними, складними й дорогими. Тому аналіз не підходить для застосування при скринінг-аналізі/способах тестування первинного

злоякісної пухлини, за допомогою яких можна просто діагностувати ймовірність виникнення злоякісної пухлини. З іншого боку, відповідно до даного винаходу, оскільки активність НК-клітин може бути виміряна шляхом стимулювання НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів і кількісного визначення вироблених секретуючих НК-клітинами цитокінів, суб'єкт, у якого знижена активність НК-клітин, може бути переважно відібраний як страждаючий злоякісною пухлиною або підданий ризику захворювання злоякісною пухлиною суб'єкт.

Відповідно до даного винаходу зразок крові може включати без обмеження цільну кров, моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і НК-клітини, які беруть у суб'єкта. Замість цільної крові МКПК або НК-клітини можуть бути використані інтактними, але відповідно до певних варіантів здійснення застосування цільної крові може бути переважним через більш просту методику й знижених витрат.

При цьому, відповідно до даного винаходу термін "суб'єкт" відноситься до ссавця, у якого є підозра на захворювання злоякісною пухлиною або на наявність рецидивуючого злоякісної пухлини, або яке прагне визначити ймовірність виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.

Присутні в зразку крові НК-клітини звичайно присутні в інактивованому стані. Відповідно до даного винаходу щонайменше один цитокін, ліпополісахарид (ЛПС) або поліінозинова:поліцитидилова кислота (полі І:Ц) може бути використаний у якості засобу, також названого в даному документі агоністом або активатором, яке служить для стимуляції таких НК-клітин у зразку крові й штучної активації НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів. У такому випадку застосовуваний для активації НК-клітин цитокін може являти собою інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 і інтерлейкін 18 або їх комбінації. Інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15, інтерлейкін 18, ЛПС або полі І:Ц широко відомі в даній області техніки як стимулюючі до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів. Тому, відповідно з одним із ілюстративних варіантів здійснення даного винаходу, стимуляція НК-клітин може бути здійснена шляхом інкубування зразка крові щонайменше з одним цитокіном, включаючи інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 і/або інтерлейкін 18, або шляхом інкубування зразка крові із ЛПС або полі І:Ц.

Відповідно з одним необмежуваним варіантом здійснення стимуляція НК-клітин може бути здійснена шляхом інкубування зразка крові з інтерлейкіном 2. Інтерлейкін 2 є одним із секретуючих Т-клітинами цитокінів, і відомо, що він асоційований з активацією НК-клітин Т-клітинами при адаптивній імунній відповіді *in vivo*. Також, інтерлейкін 2 являє собою цитокін, який звичайно широко використовується для активації НК-клітин *in vitro*. Отже, стимуляція НК-клітин може бути здійснена шляхом інкубування зразка крові з інтерлейкіном 2.

Відповідно до іншого необмежувачого варіанта здійснення стимуляція НК-клітин може бути здійснена шляхом інкубування зразка крові з інтерлейкіном 2 і інтерлейкіном 12. У випадку із хворими злоякісним захворюванням на ранній стадії активність Т-клітин може бути високою навіть при низькій активності НК-клітин. На відміну від цього, у випадку із хворими злоякісним захворюванням на пізній стадії, активність Т-клітин, а також НК-клітин може бути низькою. Інтерлейкін 12 бере участь в активації Т-клітин, а також НК-клітин. Таким чином, при обробці інтерлейкіном 12 з інтерлейкіном 2 секретовані внаслідок стимуляції Т-клітин цитокіни додають до секретованих НК-клітинами цитокінам. Тому, можна оцінити загальний рівень імунітету, а також протираковий імунітет НК-клітин і використовувати цей рівень як маркер, який демонструє ступінь розвитку злоякісної пухлини або прогноз лікування злоякісної пухлини. Інтерлейкін 15 і інтерлейкін 18 є секретуючими активованими дендритними клітинами й макрофагами цитокінами й індукують активацію й ріст НК-клітин у ході вродженої імунної відповіді *in vitro*. Зокрема, при об'єднанні інтерлейкіну 12 з інтерлейкіном 15 або інтерлейкіном 18 для стимулювання в НК-клітин секреції секретуючих НК-клітинами цитокінів може бути використана відносно мала кількість інтерлейкіну 12. Таким чином, стимуляція НК-клітин може бути ефективно здійснена шляхом інкубування зразка крові з інтерлейкіном 12 і інтерлейкіном 15 або з інтерлейкіном 12 і інтерлейкіном 18.

Відповідно до даного винаходу цифрову величину секретуючих НК-клітинами цитокінів застосовують у якості критерію для оцінки активності НК-клітин. Відповідно до даного винаходу фраза "секретуючі НК-клітинами цитокіни" відноситься до цитокінів, які секретуються НК-клітинами, зокрема цитокінів з активованих за допомогою штучної стимуляції НК-клітин. Відповідно з одним варіантом здійснення секретуючі НК-клітинами цитокіни є щонайменше одним цитокіном, обраним із групи з інтерферону-гама (IFN- γ), фактора некрозу пухлини альфа (TNF- α) і макрофагального білка запалення 1 β (MIP-1 β). Інтерферон- γ секретується НК-клітинами, дендритними клітинами, цитотоксичними Т-клітинами, Th1-клітинами й т.п. і відомий у якості цитокіну, який відіграє важливу роль в уродженому імунітеті й придбаному імунітеті для боротьби зі злоякісною пухлиною. Також, фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α) знищує

злаякісні клітини й додатково бере участь у кілінгі стороннього об'єкта, такого як бактерія, індукуючи активацію Т-клітин і відіграючи роль додаткового фактору для продукування антитіла В-клітинами. Тому, наприклад, якщо цифрова величина інтерферону- γ або фактора некрозу пухлини альфа менше, чим цифрова величина інтерферону- γ або фактора некрозу пухлини альфа в здорової людини, то це вказує на те, що існує проблема з активністю НК-клітин для боротьби зі злаякісною пухлиною. Отже, можна визначити активність НК-клітин шляхом порівняння кількості секретуючого штучно активованими НК-клітинами інтерферону- γ або фактора некрозу пухлини альфа з кількістю інтерферону- γ або фактора некрозу пухлини альфа в здорової людини.

При цьому, макрофагальний білок запалення 1β (MIP- 1β) може бути використаний у якості контрольної групи для порівняння активації НК-клітин. Як показано в наступних прикладах, цифрова величина макрофагального білка запалення 1β (MIP- 1β) є однаково високою як у здорових людей, так і у хворих злаякісним захворюванням. Таким чином, макрофагальний білок запалення 1β (MIP- 1β) може бути використаний для аналізу активності НК-клітин у здорових людей і хворих злаякісним захворюванням або може бути використаний у якості контрольної групи для аналізу за допомогою набору для діагностики злаякісної пухлини.

Кількісне визначення секретуючих НК-клітинами цитокінів може бути здійснене за допомогою будь-яких відомих у даній області способів, але даний винахід ними не обмежується. Наприклад, кількісне визначення інтерферону- γ може бути здійснене за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу інтерферону- γ (ІФА інтерферону- γ).

При цьому, щонайменше один цитокін, включаючи інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 або інтерлейкін 18, який застосовують як засіб, що служить для стимуляції НК-клітин у зразку крові й штучної активації НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів, може перебувати у формі химерного білка зі стабілізуючим пептидом.

Інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 або інтерлейкін 18 у формі химерного білка зі стабілізуючим пептидом може забезпечити аналогічну біологічну активність і високу стабільність при зберіганні в порівнянні з інтерлейкіном 2, інтерлейкіном 12, інтерлейкіном 15 або інтерлейкіном 18 дикого типу. Наприклад, якщо цитокін пов'язаний з таким стабілізуючим пептидом, те цитокін має споконвічну активність, у той час же зберігаючи стабільність, незважаючи на такі зміни в навколишньому середовищі, як ліофілізація.

Стабілізуючий пептид може бути зв'язаний N- або C-кінцем інтерлейкіну 2, інтерлейкіну 12, інтерлейкіну 15 або інтерлейкіну 18, і одержання такого химерного білка може бути здійснене за допомогою відомих способів одержання химерних білків.

Відповідно з одним ілюстративним варіантом здійснення пептид із C-кінцевим кислим хвостовим доменом (амінокислотною послідовністю кислого хвоста альфа-синуклеїну, ATS) сімейства синуклеїнів може бути використаний у якості стабілізуючого пептиду, який може бути пов'язаний з інтерлейкіном 2, інтерлейкіном 12, інтерлейкіном 15 або інтерлейкіном 18, але даний винахід не обмежується цим. У зареєстрованому патенті Кореї № 10-0506766 розкривається, що пептид ATS надає білку-партнеру в химерному білку стійкість до впливів навколишнього середовища.

Відповідно з одним ілюстративним варіантом здійснення стабілізуючий пептид, який може бути використаний відповідно до даного винаходу, включає стабілізуючий пептид, обраний з амінокислотних залишків 103-115, амінокислотних залишків 114-126, амінокислотних залишків 119-140 і амінокислотних залишків 130-140 C-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотних залишків 85-134 C-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну, амінокислотних залишків 96-127 C-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну й амінокислотних залишків 96-127 C-кінцевого кислого хвостового домену сіноретину. Відповідно до даного винаходу амінокислотну послідовність пептиду ATS, пептид ATS і спосіб одержання, що включає їх химерного білка можна здійснити за допомогою способу, розкритого в зареєстрованому патенті Кореї № 10-0506766. Якщо звернутися до наступних прикладів, то в них показано, що злитий з пептидом ATS інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 або інтерлейкін 18 має високу стабільність і проявляє подібну з версією дикого типу активність при активації цитокіну Т-лімфоцитом.

Відповідно з одним варіантом здійснення етап стимулювання НК-клітин у зразку крові, таким чином штучно активуючи НК-клітини до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів, може бути здійснений в утримуючому білок-носії середовищі. Білок-носії відповідає за стабілізацію цитокінів, таких як інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 або інтерлейкін 18, які використовуються в якості засобу для стимуляції НК-клітин у зразку крові й штучної активації НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів і, таким чином, для індукції НК-клітин до продукування більшої кількості секретуючих НК-клітинами цитокінів. Білок-носії,

відповідно до певних варіантів здійснення, може являти собою бичачий сироватковий альбумін або людський сироватковий альбумін, але не обмежується ними.

При цьому, спосіб виміру активності NK-клітин може бути використаний для скринінг-аналізу ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.

Активність NK-клітин може бути виміряна шляхом порівняння кількості секретуючих NK-клітинами цитокінів, які секретируються штучно активованими NK-клітинами, з кількістю секретуючих NK-клітинами цитокінів у здорової людини. У цьому випадку, якщо кількість секретуючих NK-клітинами цитокінів менше, чим кількість секретуючих NK-клітинами цитокінів у здорової людини, то активність NK-клітин вважають зниженою. Отже, можна оцінити ризик захворювання злоякісною пухлиною або рецидиву злоякісної пухлини. Якщо активність NK-клітин знижена в порівнянні зі здоровою людиною, суб'єкт може бути первинно класифікований як страждаючий злоякісною пухлиною пацієнт або хворий рецидивуючою злоякісною пухлиною. Також, ймовірність захворювання або рецидиву злоякісної пухлини можуть бути діагностовані за допомогою додаткового діагностичного способу, такого як КТ, МРТ або позитрон-емісійна томографія (ПЕТ) для звичайно здійснюваної діагностики злоякісної пухлини, і за допомогою завершального аналізу тканини. Хоча спосіб відповідно до даного винаходу не є способом остаточної діагностики злоякісної пухлини, спосіб має хороші переваги в тому, що може бути здійснений первинний скринінг-аналіз на ймовірність виникнення або рецидиву злоякісної пухлини за допомогою зразка крові.

Крім того, даний винахід відноситься до набору для виміру активності NK-клітин, який включає засіб, такий як агоніст або активатор, які служать для стимуляції NK-клітин у зразку крові й штучної активації NK-клітин до вироблення секретуючих NK-клітинами цитокінів. Такий набір для виміру активності NK-клітин може бути використаний для швидкого здійснення вищезгаданого способу виміру активності NK-клітин.

В наборі для виміру активності NK-клітин засіб, який служить для стимуляції NK-клітин і штучної активації NK-клітин до вироблення секретуючих NK-клітинами цитокінів, може являти собою в меншій мірі один цитокін, ЛПС або полі І:Ц, і такий цитокін може бути обраний із групи, яка складається з інтерлейкіну 2, інтерлейкіну 12, інтерлейкіну 15 і інтерлейкіну 18.

Крім засобу, який служить для стимуляції NK-клітин і штучної активації NK-клітин до вироблення секретуючих NK-клітинами цитокінів, таких як інтерферон- γ , такий набір для діагностики злоякісної пухлини може включати додаткові компоненти для виміру активності NK-клітин, наприклад, антитіло для кількісного визначення секретуючих NK-клітинами цитокінів і підложку. Відповідно з одним варіантом здійснення набір по даному винаходу додатково містить щонайменше одне антитіло, обране із групи з антитіла до IFN- γ , антитіла до TNF- α і антитіла до MIP-1 β .

Антитіло в наборі по даному винаходу може бути зафіксоване на твердій підложці. Антитіло може бути зафіксоване за допомогою різних способів, які описані в літературі (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane; Cold Spring Harbor, 1988). Підходяща тверда підложка може включати планшет для клітинної культури, планшет для ІФА, пробірку й полімерну плівку. Крім того, тверда підложка включає металевий каркас, синтетичне скло, агарозну гранулу, чашку, плоский корпус або інші плівки або покриття, які підтримуються твердими носіями або прикріплені до них.

Також, набір відповідно до даного винаходу може включати застосовуваний для імунологічного аналізу реактив з антитілом, що вибірково розпізнає секретуючі NK-клітинами цитокіни, такі як інтерферон- γ . Імунологічний аналіз може включати всі способи, за допомогою яких може бути виміряне зв'язування антигену з антитілом відповідно до даного винаходу. Такі способи відомі в даній області й включають, наприклад, імуоцитохімію й імуогістохімію, радіоімуноаналіз, ІФА, імуоблотинг, аналіз по Фарру, реакцію із преципітином, турбідиметричний спосіб, імуодифузію, протиточний електроліз, однорадикальну імуодифузію й імуофлуоресценцію.

Застосовуваний для імунологічного аналізу реактив включає підходящий носій, здатний генерувати обумовлений сигнал мітку, розчинник і детергент. Також, якщо матеріалом мітки є фермент, то реактив може включати субстрат, за допомогою якого можна виміряти ферментативну активність, і засіб для зупинки реакції. Підходящий носій може включати без обмеження розчинний носій, наприклад, один з відомих у даній області фізіологічно доступних буферів (наприклад, PBS) або нерозчинний носій, наприклад, полімер, такий як магнітні частки, утворені шляхом нанесення металу на полістирол, поліетилен, поліпропілен, поліефір, поліакрилнітрил, фторвмісну смолу, зшиваємий декстран, полісахарид, та латекс, і інші види паперу, скла, металів, агарози і їх комбінацій.

В якості мітки, яка може генерувати обумовлений сигнал, може бути використаний фермент флуоресцируючий матеріал, люмінесцируючий матеріал і радіоактивний матеріал. В якості ферменту може бути використана пероксидаза, лужна фосфатаза, β -D-галактозидаза, глюкооксидаза, малатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, інвертаза й т.п., а в якості люмінесцируючого матеріалу може бути використаний ізотіоціанат флуоресцеїн або фікобіліпротейн, і в якості радіоактивного матеріалу можуть бути використані I_{131} , C_{14} або H_3 . Крім наведених як приклад матеріалів відповідно до даного винаходу можна використовувати будь-які матеріали, які можуть бути використані для імунологічного аналізу.

Крім того, даний винахід відноситься до химерного білка, що включає цитокін, пов'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів. В цьому випадку цитокін може являти собою інтерлейкін 2, інтерлейкін 12, інтерлейкін 15 або інтерлейкін 18. Як описано вище, химерний білок може бути використаний у якості засобу, який служить для стимуляції НК-клітин і штучної активації НК-клітин до вироблення секретуючих НК-клітинами цитокінів і забезпечує більш високу стабільність, незважаючи на зміни в навколишньому середовищі, такі як ліофілізація або довгострокове зберігання, у порівнянні з інтерлейкіном 2, інтерлейкіном 12, інтерлейкіном 15 або інтерлейкіном 18 дикого типу.

Відповідно з одним ілюстративним варіантом здійснення химерний білок може являти собою химерний білок, в якому інтерлейкін 2 пов'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.

Відповідно до іншого ілюстративного варіанта здійснення химерний білок може являти собою химерний білок, в якому інтерлейкін 12 пов'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.

Відповідно з ще одним ілюстративним варіантом здійснення химерний білок може являти собою химерний білок, в якому інтерлейкін 15 пов'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.

Відповідно з ще одним ілюстративним варіантом здійснення химерний білок може являти собою химерний білок, в якому інтерлейкін 18 пов'язаний з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.

Пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів у химерному білку може також бути обраний з амінокислотних залишків 103-115, амінокислотних залишків 114-126, амінокислотних залишків 119-140 і амінокислотних залишків 130-140 С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотних залишків 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну, амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну й амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену сіноретину.

Крім того, даний винахід відноситься до застосування химерного білка для активації НК-клітин. Як описано вище, такий химерний білок може бути використаний для активації НК-клітин у крові для того, щоб сприяти секреції секретуючих НК-клітинами цитокінів.

Отже, даний винахід відноситься до композиції для активації НК-клітин. У цьому випадку композиція включає щонайменше один химерний білок, обраний із групи, яка складається з інтерлейкіну 2, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, інтерлейкіну 12, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, інтерлейкіну 15, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, і інтерлейкіну 18, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.

Відповідно з одним ілюстративним варіантом здійснення пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів може бути обраний з амінокислотних залишків 103-115, амінокислотних залишків 114-126, амінокислотних залишків 119-140 і амінокислотних залишків 130-140 С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотних залишків 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну, амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну й амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену сіноретину.

При цьому, композиція для активації НК-клітин крім злитих зі стабілізуючим пептидом цитокінів може включати буфер, здатний підтримувати й зберігати химерний білок.

Більше того, даний винахід відноситься до набору для діагностики злоякісної пухлини, який включає щонайменше один химерний білок, обраний із групи, яка складається з інтерлейкіну 2, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, інтерлейкіну 12, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, інтерлейкіну 15, пов'язаного з пептидом із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів, і інтерлейкіну 18, пов'язаного з пептидом с С-кінцевим кислим хвостовим

доменом із сімейства синуклеїнів. Як описано вище, при інкубації взятого від суб'єкта зразка крові з химерним білком у зразку крові активуються NK-клітини. Отже, активність NK-клітин у суб'єкта може бути виміряна кількісним визначенням виробленого в результаті активації NK-клітин інтерферону- γ , таким чином первинно діагностуючи злоякісну пухлину шляхом класифікації суб'єктів, які мають більш низьку активність NK-клітин, чим активність у здорової людини, як підданих ризику захворювання злоякісною пухлиною або, що мають рецидив злоякісної пухлини пацієнтів.

Відповідно з одним ілюстративним варіантом здійснення пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів може бути обраний з амінокислотних залишків 103-115, амінокислотних залишків 114-126, амінокислотних залишків 119-140 і амінокислотних залишків 130-140 С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотних залишків 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну, амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну й амінокислотних залишків 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену сіморетину.

Крім химерного білка такий набір для діагностики злоякісної пухлини може включати додаткові компоненти, які застосовуються для здійснення способу діагностики відповідно до даного винаходу, наприклад, антитіло для кількісного визначення секретуючих NK-клітинами цитокінів і підложку. Ці компоненти описані вище у зв'язку з набором для виміру активності NK-клітин. Також у набір можуть бути включені інструкції для застосування цих компонентів в описаному вище способі.

Зрозуміло, що ці й інші ознаки, аспекти й переваги кращих варіантів здійснення по даному винаходу будуть більш повно описані в наступних прикладах. Також слід розуміти, що ці приклади наведені лише з метою ілюстрації й не припускають обмеження обсягу даного винаходу. Фахівцям в даній області буде зрозуміло, що інші аналоги й модифікації можуть бути здійснені без відхилення від заявленого обсягу даного винаходу.

Приклади

Приклад одержання 1: Побудова вектора експресії з химерним білком стабілізуючого пептиду-IL

Для одержання IL-2, IL-12 IL-15 або IL-18, злитого зі стабілізуючим пептидом, будували вектор експресії. Який містить амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну (SEQ ID NO: 24; названий далі "SP") пептид використовували як стабілізуючий пептид. КДНК IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 і IL-18 одержували шляхом виділення загальної РНК із лімфоцитів людини за допомогою набору для виділення РНК (Invitron Biotechnology) і зворотної транскрипції загальної РНК за допомогою зворотної транскриптази (Invitrogen). Отриману в результаті КДНК використовували в якості матриці й ампліфікували за допомогою ПЦР із застосуванням наступних специфічних до кожного гена КДНК праймерів:

IL2-22-BamH1-F: ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (SEQ ID NO:11)

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

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

IL12-p40-328-CT-His: ATGGTGATGATGACTGCAGGGCACAGATGCCC (SEQ ID NO:14)

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

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

IL15-49-Nde: GAGTCAAGCATATGAACTGGGTGAATGTAA (SEQ ID NO:17)

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

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

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

Фіг. 1 є схематичним зображенням, яке демонструє конструкти химерних продуктів SP із зазначеними цитокінами, у тому числі IL2, IL12p35, IL12p40, IL15 і IL-18. Як показано на цій фігурі, химерний продукт Sp-hIL2 будували шляхом послідовного субклонування генів, які кодують ампліфікований за допомогою ПЦР hIL2 і амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну, в вектор експресії pRSETA. Химерний продукт Sp-hIL12p40 будували шляхом послідовного субклонування генів, якф кодують ампліфікований за допомогою ПЦР hIL12p40 і амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну, в вектор експресії pVL1393. Химерний продукт SP-hIL12p35 будували шляхом послідовного субклонування генів, які кодують ампліфікований за допомогою ПЦР hIL12p35 і амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну, в вектор експресії pVL1393. Химерний продукт hIL15-SP hIL12p35 будували шляхом послідовного субклонування генів, які кодують ампліфікований за допомогою ПЦР hIL15 і амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну, в вектор експресії pRSETA. Химерний продукт SP-hIL18 будували шляхом послідовного субклонування генів, які кодують ампліфікований за допомогою ПЦР hIL18 і

амінокислотні залишки 119-140 α -синуклеїну, в вектор експресії pRSETA. Послідовності всіх конструктів підтверджували за допомогою секвенування ДНК.

Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислотні послідовності химерного продукту SP-hIL2 викладені в SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно. Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислотні послідовності химерного продукту SP-hIL12p40 викладені в SEQ ID NO: 3 і 4, відповідно. Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислотні послідовності химерного продукту SP-hIL12p35 викладені в SEQ ID NO: 5 і 6, відповідно. Як показано на Фіг. 1, послідовність із 6X His-міткою містилася в кожному векторі з метою виділення й очищення химерного продукту SP-hIL12p40 і химерного продукту SP-hIL12p35, які експресувались за допомогою вірусів. Послідовності нуклеїнових кислот і амінокислотні послідовності химерного продукту hIL15-SP викладені в SEQ ID NO: 7 і 8, відповідно. Також, послідовності нуклеїнових кислот і амінокислотні послідовності химерного продукту SP-hIL18 викладені в SEQ ID NO: 9 і 10, відповідно.

Приклад одержання 2: Експресія й очищення рекомбінантного химерного білка SP

Побудований для експресії рекомбінантного білка SP-hIL2 вектор експресії трансформували в BL21(DE3)RIPL *Escherichia coli* (Invitrogen) і інкубували. Розчин культури центрифугували при 10000 об/хв. протягом 10 хвилин з одержанням клітинного осаду. Клітинний осад ресуспендовали в фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS, pH 7,4) і потім гомогенізували за допомогою руйнування ультразвуком. Експресований у нерозчинній формі в *E. coli* химерний білок SP піддавали процедурі рефолдингу й потім очищали за допомогою іонообмінної смоли.

Побудовані для експресії рекомбінантного білка SP-hIL12 два вектори експресії трансфікували в лінії клітин комах, клітини sf21, з одержанням розчину вірусної культури, відповідно. Два отримані в результаті розчини вірусної культури одночасно трансфікували в лінії клітин комах sf21 з одержанням гетеродімерного білка IL12p70, в якого IL12p40 зв'язаний до IL12p35, та який потім очищали.

Побудований для експресії рекомбінантного білка hIL15-SP вектор експресії трансформували в BL21(DE3)RIPL *E. coli* (Invitrogen) і потім інкубували. Розчин культури центрифугували при 10000 об/хв. протягом 10 хвилин з одержанням клітинного осаду. Клітинний осад ресуспендовали в PBS (pH 7,4) і потім гомогенізували за допомогою руйнування ультразвуком. Експресований у розчинній формі в *E. coli* химерний білок SP очищали за допомогою іонообмінної смоли.

Побудований для експресії рекомбінантного білка SP-hIL18 вектор експресії трансформували в BL21(DE3)RIPL *E. coli* (Invitrogen) і потім інкубували. Розчин культури центрифугували при 10000 об/хв. протягом 10 хвилин з одержанням клітинного осаду. Клітинний осад ресуспендовали в PBS (pH 7,4) і потім гомогенізували за допомогою руйнування ультразвуком. Експресований у розчинній формі в *E. coli* химерний білок SP очищали за допомогою іонообмінної смоли.

Очищений химерний білок SP (3 мкг) піддавали електрофорезу в 15 % ДСН-ПААГ для верифікації кінцевого очищеного білка (Фіг. 2; (a) білок SP-hIL2 (ATGen, кат. № ATGK04), (b) білок IL15-SP (ATGen, кат. № ATGK06) і (c) білок SP-IL18 (ATGen, кат. № ATGK07)).

Експериментальний приклад 1: Верифікація різновидів цитокінів, здатних активувати НК-клітини в цільній крові

1 мл цільної крові від здорової людини й 1 мл середовища RPMI1640 поміщали в 24-ямковий планшет для клітинної культури, змішували з 10 нг/мл кожного з рекомбінантних інтерлейкінів IL-2, IL-12, IL-15 і IL-18 людину й потім культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і вимірювали за допомогою способу ІФА по типу сендвіча кількість інтерферону- γ у супернатанті (Фіг. 3A). В результаті, секретуючі НК-клітинами цитокіни в зразку крові здорової людини не були визначені через їх малу кількість, але при обробці зразка крові щонайменше одним з IL-2, IL-12, IL-15 і IL-18 рівень секретуючих НК-клітинами цитокінів у зразку крові підвищувався. При обробці зразка крові тільки стимулятором НК-клітин було видно, що рівень інтерферону- γ у зразку крові підвищувався, особливо в оброблених IL-2 і оброблених IL-12 груп (Фіг. 3A).

Також, 1 мл цільної крові від здорової людини й 1 мл середовища RPMI1640 поміщали в 24-ямковий планшет для клітинної культури, обробляли різними комбінаціями рекомбінантних інтерлейкінів людини, як показано на Фіг. 3B (10 нг/мл кожного), і культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і вимірювали рівень інтерферону- γ таким самим способом, як описано вище. При обробці цільної крові різними комбінаціями стимуляторів НК-клітин було видно, що рівень інтерферону- γ підвищувався, особливо в присутності IL-2+IL-12 (Фіг. 3B).

Додатково, для виміру рівня інтерферону- γ після обробки комбінацією IL-12 і IL-15 цільну кров обробляли концентрацією стимулятора NK-клітин, як показано на Фіг. 3С, і культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і рівень інтерферону- γ вимірювали таким самим способом, як описано вище.

Для виміру рівня інтерферону- γ після обробки комбінацією IL-12 і IL-18 цільну кров також обробляли концентрацією стимулятора NK-клітин, як показано на Фіг. 3D, і потім культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і рівень інтерферону- γ вимірювали таким самим способом, як описано вище.

Експериментальний приклад 2: Верифікація різновидів цитокінів, секретуючих штучно активованими за допомогою IL-2 NK-клітинами

Зразки цільної крові забирали від 61 здорової людини й від 50 хворих злоякісним захворюванням. 1 мл цільної крові й 1 мл середовища RPMI1640 поміщали в 24-ямковий планшет для клітинної культури, обробляли 10 нг/мл рекомбінантного інтерлейкіну SP IL-2 людини й потім культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і рівні інтерферону- γ , TNF- α і MIP-1 β вимірювали за допомогою способу ІФА по типу сендвіча. В результаті підтверджували, що інтерферон- γ і TNF- α виділявся із цільної крові здорової людини в меншій кількості, чим такі у хворих злоякісною пухлиною, але MIP-1 β виділявся зі зразків цільної крові здорової людини й хворого злоякісною пухлиною, як показано на Фіг. 4.

У випадку застосовуваних для тесту на захворювання реактивів для діагностики *in vitro* використовували ряд валідаційних методик. В цілому, відповідно до даного винаходу використовували нормальний діапазон і аналіз граничного значення. Нормальний діапазон являє собою еталонний діапазон, який використовували для виміру середнього значення й середньоквадратичного відхилення в кожній групі зразків, а аналіз граничного значення являє собою спосіб виміру клінічної чутливості й специфічності шляхом обчислення розрахункової величини діагностичного реактиву *in vitro*. Клінічна чутливість означає ймовірність, що визнається, як демонструюча позитивні результати діагностичного тесту у випадку, коли пацієнт страждає захворюванням, а клінічна специфічність означає ймовірність, що визнається, як демонструюча негативні результати діагностичного тесту у випадку, коли пацієнт не страждає захворюванням.

Припустимо, що якщо граничне значення складало більше 10 % і менше 10 %, граничне значення, відповідно, установлювали для позитивних і негативних значень. Потім, клінічну чутливість і клінічну специфічність вимірювали за допомогою аналізу граничного значення. Результати наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

| | IFN- γ | TNF- α | MIP-1 β |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Клінічна чутливість (%) | 98,4 | 90,9 | 100 |
| Клінічна специфічність (%) | 98,0 | 69,0 | 50 |

Згідно з результатами вимірів у групах хворих злоякісним захворюванням і здорових людей IFN- γ характеризується чутливістю 98,4 % і специфічністю 98 %. Незважаючи на те, що згідно з результатами вимірів TNF- α характеризується чутливістю 90,9 % і специфічністю 69 %, які були нижче, чим в IFN- γ , розроблені на даний момент набори для діагностики злоякісної пухлини характеризуються специфічністю максимум 20-30 %. Таким чином, очікується, що TNF- α , що характеризується специфічністю приблизно 70 % або більше, також може бути використаний у якості маркера для наборів для діагностики злоякісної пухлини з метою виміру активності NK-клітин.

Експериментальний приклад 3: Порівняння стабільності SP IL-2 і IL-2

Для порівняння стабільності SP IL-2 і IL-2 від двох людей забирали зразки цільної крові. 1 мл від кожного отриманого зразка цільної крові й 1 мл середовища RPMI1640 поміщали в 24-ямковий планшет для клітинної культури й потім додавали SP IL-2 і IL-2, ретельно перемішали, а потім культивували протягом 24 годин. Після 24-годинного культивування забирали супернатант і рівні інтерферону- γ вимірювали за допомогою способу ІФА по типу сендвіча. За результатами аналізів активності IL-2 і SP IL-2 було видно, що відмінність в активності двох білків було відсутнє (Фіг. 5A). Однак, при обробці цільної крові SP IL-2, а не IL-2, в умовах культивування цільної крові, відповідно, підтверджували, що NK-клітини активувалися SP IL-2, таким чином підвищуючи рівень інтерферону- γ (Фіг. 5B). Це вказує на відсутність відмінності в активності двох білків, але стабільність IL-2 підвищується у зв'язку із застосуванням SP.

Експериментальний приклад 4: Порівняння активності NK-клітин від здорових людей і хворих злоякісним захворюванням стосовно умов стимулювання NK-клітин

1 мл кожного зі зразків цільної крові забирали від 20 здорових людей і від 48 хворих злоякісним захворюванням на термінальній стадії (стадія 3-4) і 1 мл середовища RPMI1640 поміщали в 24-ямковий планшет для культивування, кожний зразок розділяли на дві підгрупи і підгрупи обробляли SP IL-2 (10 нг/мл) (умова А) і SP IL-2 (5 нг/мл) + IL-12 (5 нг/мл) (умова В), відповідно, і потім культивували протягом 24 годин. Після культивування забирали супернатант і вимірювали рівні інтерферону- γ за допомогою способу ІФА по типу сендвіча.

У результаті було видно, що приблизно 90 % здорових людей мали високий рівень інтерферону- γ , але більшість хворих злоякісним захворюванням мали низький рівень інтерферону- γ у випадку умови А, як показано на Фіг. 6. У випадку умови В також було видно, що здорові люди мали високий рівень інтерферону- γ , а більшість хворих злоякісним захворюванням мали низький рівень інтерферону- γ . Однак, високий рівень інтерферону- γ був вище у хворих злоякісним захворюванням у випадку умови В, у порівнянні з випадком умови А. При обробці зразка цільної крові тільки SP IL-2 специфічно активувалися лише NK-клітини (див. наступний експериментальний приклад 5 і Фіг. 7), але NK-клітини були здатні активуватися разом з Т-клітинами при обробці зразка цільної крові комбінацією SP IL-2 і IL-12 і, отже, рівень інтерферону- γ можна було підвищити за рахунок активації Т-клітин. Тому, вважають, що високий рівень інтерферону- γ можна спостерігати в деяких хворих злоякісним захворюванням, у яких зберігається активність Т-клітин. Якщо хворі злоякісним захворюванням мають низький рівень інтерферону- γ навіть при обробці відповідно до умови В, то можна зробити висновок, що у хворих злоякісним захворюванням були знижені протираковий імунітет NK-клітин і компоненти загального системного імунітету. Вважають, що це можна використовувати як важливий маркер для визначення й прогнозу прогресування злоякісної пухлини.

Експериментальний приклад 5: Порівняння активності NK-клітин від здорових людей і хворого злоякісним захворюванням при впливі IL2 залежно від типу зразків крові

Для визначення відмінності здатності секретувати інтерферон- γ при впливі IL2 залежно від типу зразків крові від здорових людей здійснювали наступний експеримент. Вимірювали (а) здатність секретувати інтерферон- γ в NK-клітин на 1 нг/мл IL2 від Т-клітин, (b) здатність секретувати інтерферон- γ в NK-клітин на 1 нг/мл IL2 від NK-клітин, (c) здатність секретувати інтерферон- γ в NK-клітин на 1 нг/мл IL2 із цільної крові й (d) здатність секретувати інтерферон- γ в NK-клітин залежно від концентрації IL2 від МКПК. Результати показані на Фіг. 7. Інтерферон- γ вимірювали таким самим способом, як описано вище. У результаті, оскільки змінилася кількість інтерферону- γ , секретуючого в результаті активації IL2 Т-клітин, але вона не сильно відрізнялася від кількості інтерферону- γ у не обробленій групі, то Т-клітини не були придатні для застосування у вигляді зразка крові. У цільній крові, МКПК і NK-клітини мають значиму відмінність у кількості інтерферону- γ у порівнянні з кількістю інтерферону- γ у не обробленій групі. Тому, цільну кров, МКПК і NK-клітини оцінювали як придатні зразки крові для застосування в способі й наборі відповідно до даного винаходу.

Експериментальний приклад 6: Порівняння активності NK-клітин від здорових людей при впливі ЛПС

Як інший приклад засобу, що служить для стимуляції NK-клітин у зразку крові й штучної активації NK-клітин до вироблення інтерферону- γ , для виміру кількості інтерферону- γ із цільної крові людини використовували ЛПС. Як показано на Фіг. 8, виявили, що секрецію інтерферону- γ індукували за допомогою 50 нг/мл ЛПС, що вказує на те, що NK-клітини можуть бути штучно активовані до вироблення інтерферону- γ навіть при стимуляції NK-клітин неспецифічним агоністом, таким як ЛПС.

Експериментальний приклад 7: Стимуляція NK-клітин за допомогою hIL12 і hIL15, злитих зі стабілізуючим пептидом

У якості пробірки для інкубування NK-клітин здобували й використовували утримуючу антикоагулянт натрієву сіль гепарину пробірку (BD) для запобігання згортання крові. Забирали 5 мл цільної крові й поміщали в утримуючу антикоагулянт (натрієву сіль гепарину) пробірку. 1 мл отриманої цільної крові змішали із середовищем RPMI1640 і активаторами NK-клітин, туди ж додавали Sp-hIL2/hIL12. Отриману в результаті суміш інкубували при 37 °C протягом 16-24 годин. Стимуляцію NK-клітин у цільній крові за допомогою злитого зі стабілізуючим пептидом SP hIL2 і hIL12 визначили шляхом виміру кількості інтерферону- γ у крові, інкубованій відповідно до описаного вище в експериментальному прикладі способу.

При цьому, вимірювали кількість секретованого інтерферону- γ залежно від умов культивування цільної крові. Як показано на Фіг. 9, було виявлено, що здатність секретувати інтерферон- γ в NK-клітин підвищувалася при інкубації NK-клітин в PBS з додаванням білка-

носія, такого як бичачий сироватковий альбумін, у порівнянні з тим, коли НК-клітини інкубували в PBS.

Експериментальний приклад 8: Відмінність секреції інтерферону- γ залежно від стадії прогресування злоякісної пухлини

Для визначення кількості секретованого інтерферону- γ залежно від стадії прогресування злоякісної пухлини цільну кров від хворої злоякісною пухлиною пацієнтки 1 (пацієнтка повністю видужала від злоякісної пухлини молочної залози), хворого злоякісною пухлиною пацієнта 2 (хворого підозрою на захворювання злоякісною пухлиною мозку) і здорової людини інкубували протягом 24 годин у середовищі RPMI1640 з додаванням 100 нг/мл IL12 і 1000 нг/мл IL15 і вимірювали описаним вище способом кількість секретованого інтерферону- γ . Також, цільну кров піддали проточній цитометрії.

У результаті, були підтверджені здатності секретувати інтерферон- γ , по порядку, у здорової людини, хворої злоякісною пухлиною пацієнтки 1 і хворого злоякісною пухлиною пацієнта 2, як показано на Фіг. 10. Таким чином, було підтверджено, що кількості секретованого інтерферону- γ залежно від стадії прогресування злоякісної пухлини відрізнялися. На підставі цих фактів, було видно, що спосіб відповідно до даного винаходу може бути використаний для виміру кількості секретованого НК-клітинами інтерферону- γ у зразку крові, таким чином прогнозуючи ймовірність виникнення й стадію прогресування злоякісної пухлини або прогнозуючи рецидив злоякісної пухлини.

Експериментальний приклад 9: Кількісне визначення інтерферону- γ , виробленого в результаті стимуляції НК-клітин

У якості пробірки для інкубування НК-клітин придбали й використовували утримуючу антикоагулянт натрієву сіль гепарину пробірку (BD) для запобігання згортання крові. Від восьми здорових людей забирали по 5 мл цільної крові й поміщали в утримуючу антикоагулянт (натрієву сіль гепарину) пробірку. 1 мл отриманої цільної крові змішали із середовищем RPMI1640, туди ж додавали Sp-hIL12/hIL15-SP, зв'язаний зі стабілізуючим пептидом. Отриману в результаті суміш інкубували при 37 °C протягом 16-24 годин.

Інкубовану при 37 °C цільну кров від восьми здорових людей центрифугували при 1500-2000 g з одержанням сироватки у вигляді супернатанту. Потім забирали 150-200 мкл сироватки й провели ІФА на інтерферон- γ . Первинне антитіло з 0,05 % твіну (моноклональне антитіло до інтерферону- γ людини, Atgen, кат. № ATGK02) розвели буфером для сенсibilізації поверхонь (0,1 карбонат натрію, pH 9,5) у співвідношенні 1:1000. Розведене первинне антитіло розділяли на 96-ямковому титровальному мікропланшеті для ІФА (Nunc Maxisorp; NUNC, Непервіл, Ілінойс) з дозою по 100 мкл/лунка й залишили при температурі 4 °C на 16-18 годин. Після цього розчин видалили з планшета й промили планшет промиваючим розчином (утримуючим 0,05 % твіну 20 PBS) з дозою по 400 мкл/лунка. У цьому випадку промивання здійснювали три рази. Потім, PBS утримуючий 10 % фетальної бичачої сироватки (ФБС) розділяли з дозою по 300 мкл/лунка й витримали при кімнатній температурі протягом 1 години. Після цього розчин видалили із планшета і планшет промили PBST (утримуючим 0,05 % твіну 20 розчином PBS) з дозою по 400 мкл/лунка. У цьому випадку промивання здійснювали три рази. Покритий первинним антитілом 96-ямковий титровальний мікропланшет для ІФА герметично закрили й зберігали при 4 °C до застосування.

Стандартний розчин інтерферону- γ (PBS, що містить 200 нг рекомбінантного інтерферону- γ людини (Atgen, кат. № IFG4001) і 0,05 % Proclin 300) розвели й розділяли з дозою по 100 мкл/лунка в покритому первинним антитілом 96-ямковому титровальному мікропланшеті для ІФА, і отриману на експериментальному етапі сироватку пацієнта розділяли з дозою 100 мкл/лунка, і потім витримали при кімнатній температурі протягом 2 годин.

Таблиця 2

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

Холостий: тільки буфер, S1-S6: стандарт у серійних розведеннях, і HI (невідомо): сироватка пацієнта

Через 2 години розчин з 96-ямкового титровального мікропланшета для ІФА вилучили й промили планшет промиваючим розчином з дозою по 400 мкл/лунка. У цьому випадку промивання здійснювали три рази. Потім, вторинне антитіло (біотинізоване моноклональне антитіло до інтерферону-γ людини (Atgen кат. № ATGK03)) розвели розчином для розведення в співвідношенні 1:500, розділяли з дозою по 100 мкл/лунка й потім витримали при кімнатній температурі протягом 1 години. Після цього розчин вилучили із планшета й планшет промили три рази промиваючим розчином з дозою по 400 мкл/лунка. Розчин кон'югованого з HRP стрептавідину (Thermo Scientific, кат. № 21130) розвели розчином для розведення в співвідношенні 1:3000, розділяли з дозою по 100 мкл/лунка й потім витримали при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Потім, розведений розчин кон'югованого з HRP стрептавідину розділяли в планшеті для ІФА й інкубували протягом 1 години. Після одногодинного інкубування розчин з 96-ямкового титровального мікропланшета для ІФА вилучили й планшет промили три рази промиваючим розчином з дозою по 400 мкл/лунка.

Для готування розчину субстрату 1 мг тетраметилбензидину (ТМБ) розчинили в 1 мл диметилсульфоксиду (ДМСО) і отриману в результаті суміш розвели 9 мл 0,05 М фосфат-цитратного буфера. Потім, розчин субстрату розділяли по планшету з дозою по 100 мкл/лунка й витримали при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

Розчин для зупинення реакції (2 н. розчин сірчаної кислоти в розчині для розведення) розділяли з дозою по 100 мкл/лунка для зупинення реакції й вимірювали отриманий у результаті реакційний розчин при 450 нм за допомогою Іфа-рідера.

Здатності секретувати інтерферон-γ в НК-клітин, обмірювані із застосуванням цільної крові від восьми здорових людей, показані на Фіг. 11. Ці результати вказують на те, що при стимуляції цільної крові цитокином присутні в крові імунні клітини ефективно активуються з індукцією секреції інтерферону-γ.

Крім того, після стимуляції цільної крові від восьми здорових людей цитокином цільну кров піддали проточній цитометрії. Отримані результати відображені на Фіг. 12. Виходячи із цих результатів, виявили, що НК-клітини проявляли цитотоксичність, оскільки НК-клітини були активовані в результаті стимуляції цільної крові. CD56 був маркером НК-клітин, а CD107a був маркером, що вказує на те, що НК-клітини секретували цитотоксичні гранули. Оскільки результати по секреції інтерферону-γ на Фіг. 11 значимо корелювали з результатами по виробленій НК-клітинами цитотоксичності на Фіг. 12, було видно, що здатність секретувати інтерферон-γ в НК-клітин у результаті стимуляції цільної крові опосередковано виражає цитотоксичність НК-клітин.

Відповідно до даного винаходу ймовірність виникнення й рецидив злоякісної пухлини можуть бути діагностовані за допомогою відстеження змін імунної системи *in vivo* і виміру активності НК-клітин у крові, наприклад у суб'єкта, хворого злоякісною пухлиною, або з підозрою на злоякісну пухлину. Даний винахід може, таким чином, бути придатним для прогнозування ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини із застосуванням зразка крові від суб'єкта.

Незважаючи на те, що в даному документі були розкриті ілюстративні варіанти здійснення, слід розуміти, що можуть бути можливі інші варіанти. Такі варіанти не будуть вважатися відхиленням від об'єму ілюстративних варіантів здійснення даної заявки, і всі подібного роду модифікації, як це буде очевидно для рядового фахівця в даній області, мають на увазі як включені в об'єм наведеної далі формули винаходу.

Усі згадані в даному описі документи включені в нього за допомогою посилань.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> АТГен Ко Лтд.

<120> С СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНОЇ ПУХЛИНИ Й НАБІР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ШЛЯХОМ ВИМІРУ АКТИВНОСТІ НК-КЛІТИН

<130> 08921046WO

<150> KR 2011-0012983

<151> 2011-02-14

<160> 29

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 474

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерна кодуєча послідовність SP-hIL2

<400> 1

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatccctac ttcaagttct acaagaaaa cacagctaca actggagcat 120

ttactgctgg atttacagat gattttgaat ggaattaata attacaagaa tcccaaactc 180

accaggatgc tcacatttaa gttttacatg cccaagaagg ccacagaact gaaacatctt 240

cagtgtctag aagaagaact caaacctctg gaggaagtgc taaatttagc tcaaagcaaa 300

aactttcact taagaccag ggacttaac agcaatatca acgtaatagt tctggaacta 360

aagggatctg aaacaacatt catgtgtgaa tatgctgatg agacagcaac cattgtagaa 420

ttctgaaca gatggattac cttttgtcaa agcatcatct caacactgac ttga 474

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерний поліпептид SP-hIL2

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 1014

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерна кодуєча послідовність SP-hIL12p40

<400> 3

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cctctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatccatag ggaactgaag aaagatgttt atgtcgtaga attggattgg 120

tatccggatg cccctggaga aatggtggtc ctacctgtg acacccctga agaagatggt 180
atcacctgga ccttggacca gagcagttag gtcttaggct ctggcaaac cctgaccatc 240
caagtcaaag agtttggaga tgctggccag tacacctgtc acaaaggagg cgaggttcta 300
agccattcgc tctgtctgct tcacaaaaag gaagatggaa ttggtccac tgatatttta 360
aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc ttctaagat gcgaggccaa gaattattct 420
ggacgtttca cctgtggtg gctgacgaca atcagtactg attgacatt cagtgtcaaa 480
agcagcagag gcttcttga ccccaagggt gtgacgtgct gagctgtac actctctgca 540
gagagagtca gaggggacaa caaggagtat gactactcag tggagtgcga ggaggacagt 600
gcctgccag ctgtgagga gactctgcc attgaggtca tgggtgatgc cgttcacaag 660
ctcaagtatg aaaactacac cagcagcttc tcatcagggt acatcatcaa acctgacca 720
ccaagaact tgcagctgaa gccattaaag aattctggc aggtggaggt cagctgggag 780
taccctgaca cctggagtac tcacattcc tactctccc tgacattctg cgttcaggct 840
cagggaaga gcaagagaga aaagaaagat agagtcttca cggacaagac ctcagccacg 900
gtcatctgcc gcaaaaatgc cagcattagc gtgcgggccc aggaccgcta ctatagctca 960
tcttgagcgt aatgggcatc tgtgccctgc agtcatcacc accatcacca ctga 1014

<210> 4

<211> 337

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерний поліпептид SP-hIL12p40

<400> 4

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

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

Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu
245 250 255

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

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

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

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

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

His

<210> 5

<211> 687

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерна кодуєча послідовність SP-hIL12p35

<400> 5

atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg ccttctgagg aagggtatca agactacgaa 60

cctgaagccg gatccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttcccatgc 120

cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa 180

actctagaat ttacccttg cacttctgaa gagattgac atgaagatat cacaaaagat 240

aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggaattaa ccaagaatga aagctgtctt 300

aactcaagag aaacttcatt tatcacaac ggtagttgcc tggcctccag aaagacctct 360

tttatgatgg cctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatga ccaggtggag 420

ttcaagacca tgaatgcaa gcttctgatg gaccctaaga ggcaaatctt tctagatcaa 480

aacatgctgg cagtattga tgagctgatg caggccctga attcaacag tgagactgtg 540

ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat ttatataaaa ctaaaatcaa gctctgcata 600
 cttcttcattg ctttcagaat tcgggcagtg actattgata gagtgatgag ctatctgaat 660
 gcttcccatc atcaccatca ccaactga 687

<210> 6
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> химерний поліпептид SP-hIL12p35

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met
 130 135 140

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

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

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

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

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

His His His His
225

<210> 7
<211> 420
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> химерна кодуєча послідовність hIL15-SP

<400> 7
atgaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 60
catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 120
atgaagtgc tctcttggga gttacaagtt atttcaattg agtccggaga tgcaagtatt 180
catgatacag tagaaaatct gatcatccta gcaacaaca gttgtcttc taatgggaat 240
gtaacagaat ctggatgcaa agaattgtgag gaactggagg aaaaaatat taaagaattt 300
ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcatcaaca cttctggatc cgtactctgac 360
aatgaggcct atgaaatgcc ttctgaggaa gggtatcaag actacgaacc tgaagcctaa 420

<210> 8
<211> 139

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерний поліпептид hIL15-SP

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 549

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> химерна кодуюча послідовність SP-hIL18

<400> 9
atggaccctg acaatgaggc ttatgaaatg cctctgagg aagggtatca agactacgaa 60
cctgaagccg gatcctactt tggcaagctt gaatctaat tatcagtcac aagaaattg 120
aatgaccaag ttctcttcac tgaccaagga aatcgccctc tattgaaga tatgactgat 180
tctgactgta gagataatgc accccggacc atatttata taagtatgta taaagatagc 240
cagcctagag gtatggctgt aactatctct gtgaagtgtg agaaaattc aactctctcc 300
tgtgagaaca aaattatttc ctttaaggaa atgaatcttc ctgataacac caaggataca 360
aaaagtgaca tcatactctt tcagagaagt gtcccaggac atgataataa gatgcaatt 420
gaatcttcac catacgaagg atactttcta gcttgtaaaa aagagagaga cctttttaa 480
ctcatttga aaaaagagga tgaattgggg gatagatcta taatgttcac tgttcaaac 540
gaagactag 549

<210> 10
<211> 182
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> химерний поліпептид SP-hIL18

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Gln Asn Glu Asp
180

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

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

<400> 11
acaggatccc ctactcaag ttct 24

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Штучна послідовність

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

<400> 12
cactctcgag tcaagtcagt gttgagat 28

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 13
 gtggatccat atgggaactg aagaagatg 30

 <210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 14
 atggtgatga tgactgcagg gcacagatgc cc 32

 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 15
 gtggatccag aaacctcccc gtggc 25

 <210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

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

 <400> 16
 atggtgatga tgggaagcat tcagatagc 29

 <210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> прями́й прайме́р IL15-49-Nde

<400> 17
 gagtcaagca tatgaactgg gtgaatgtaa 30

<210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> зворотний праймер IL15-162-BamH1

<400> 18
 gtggatccag aagtgttgat gaac 24

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> прями́й прайме́р IL18-37-BamH1

<400> 19
 gtggatccta cttggcaag ctg 24

<210> 20
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> прями́й прайме́р IL18-193-EcoR1

<400> 20
 agactggaat tcctagtctt cgttttg 27

<210> 21
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> альфа- синуклеїн людини

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> альфа-синуклеїн людини / залишки 103-115 С-кінцевого
кислого хвостового домену

<400> 22

Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile Leu Glu Asp

1 5 10

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

<220>
 <223> альфа-синуклеїн людини / залишки 114-126 С-кінцевого
 кислого хвостового домену

<400> 23

Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
 1 5 10

Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu
 20

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

<220>
 <223> альфа-синуклеїн людини / залишки 119-140 С-кінцевого
 кислого хвостового домену

<400> 24

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

Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 20

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

<220>
 <223> альфа-синуклеїн людини / залишки 130-140 С-кінцевого
 кислого хвостового домену

<400> 25

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

<210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> бета-синуклеїн людини

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
130

<210> 27
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> бета-синуклеїн людини / залишки 85-134 С-кінцевого
 кислого хвостового домену

<400> 27

Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met Glu Pro Glu Gly
 20 25 30

Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln Glu Tyr Glu Pro
 35 40 45

Glu Ala
 50

<210> 28
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <223> гамма-синуклеїн людини (сіноретин)

<400> 28

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

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

Thr Lys Glu Gly Val Met Tyr Val Gly Ala Lys Thr Lys Glu Asn Val
 35 40 45

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> гамма-синуклеїн людини (сіноретин) / залишки 96-127 C-кінцевого
кислого хвостового домену

<400> 29

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

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб виміру активності природних клітин-кілерів (НК), який включає:
стимулювання НК-клітин у зразку цільної крові за допомогою інкубування зразка цільної крові
засобом, що містить щонайменше один стимулюючий цитокін, вибраний з групи, що
складається з інтерлейкіну 2, інтерлейкіну 15 та інтерлейкіну 18, таким чином штучно активуючи
НК-клітини до вироблення і секреції секретуючих НК-клітинами цитокінів; і
- 10 вимір кількості секретуючих НК-клітинами цитокінів, секретованих у зразку цільної крові, та
застосування кількості як міри для оцінки активності НК-клітин;
причому секретуючі НК-клітинами цитокіни містять інтерферон-гамма (IFN- γ), фактор некрозу
пухлини альфа (TNF- α) або обидва з них; і
причому, коли засіб містить інтерлейкін 18, засіб не містить інтерлейкін 12.
- 15 2. Спосіб за п. 1, де стимуляцію НК-клітин здійснюють за допомогою інкубування зразка цільної
крові з інтерлейкіном 2.
3. Спосіб за п. 1, де стимуляцію НК-клітин здійснюють за допомогою інкубування зразка цільної
крові з інтерлейкіном 2 і інтерлейкіном 12.
4. Спосіб за п. 1, де стимуляцію НК-клітин здійснюють за допомогою інкубування зразка цільної
20 крові з інтерлейкіном 12 і інтерлейкіном 15.
5. Спосіб за п. 1, де стимуляцію НК-клітин здійснюють за допомогою інкубування зразка цільної
крові з інтерлейкіном 15.
6. Спосіб за п. 1, де секретовані НК-клітинами цитокіни додатково містять макрофагальний
білок запалення-1 β (MIP-1 β).
25 7. Спосіб за п. 1, де секретованим НК-клітинами цитокіном є інтерферон-гамма (IFN- γ).

8. Спосіб за п. 1, де секретованим NK-клітинами цитокином є фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α).
9. Спосіб за п. 6, де макрофагальний білок запалення-1 β (MIP-1 β) застосовують як контрольну групу для порівняння активації NK-клітин з активацією в здорової людини.
- 5 10. Спосіб за п. 1, де вимір кількості секретованих NK-клітинами цитокинів здійснюють за допомогою імуноаналізу.
11. Спосіб за п. 10, де імуноаналіз являє собою твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА).
12. Спосіб за п. 1, де щонайменше один стимулюючий цитокін знаходиться у формі химерного білка зі стабілізуючим пептидом.
- 10 13. Спосіб за п. 12, де стабілізуючий пептид являє собою пептид із С-кінцевим кислим хвостовим доменом із сімейства синуклеїнів.
14. Спосіб за п. 13, де стабілізуючий пептид містить амінокислотні залишки 103-115 (SEQ ID NO: 22), амінокислотні залишки 114-126 (SEQ ID NO: 23), амінокислотні залишки 119-140 (SEQ ID NO: 24) або амінокислотні залишки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-кінцевого кислого хвостового домену α -синуклеїну, амінокислотні залишки 85-134 С-кінцевого кислого хвостового домену β -синуклеїну (SEQ ID NO: 27), амінокислотні залишки 1-127 γ -синуклеїну (SEQ ID NO: 28), або амінокислотні залишки 96-127 С-кінцевого кислого хвостового домену γ -синуклеїну (SEQ ID NO: 29).
- 15 15. Спосіб за п. 1, де етап стимулювання NK-клітин у зразку цільної крові, таким чином штучно активуючи NK-клітини до вироблення і секреції секретуючих NK-клітинами цитокинів, здійснюють у розчині (ліофілізованому або рідкому), що містить білок-носії.
- 20 16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, де зазначений спосіб призначений для визначення ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.
17. Спосіб за п. 16, де зниження кількості секретованих NK-клітинами цитокинів у суб'єкта в порівнянні з рівнями в здорових людей є показником ймовірності виникнення або рецидиву злоякісної пухлини.
- 25 18. Спосіб за п. 1, де вимір активності NK-клітин включає порівняння виміряної кількості секретованих NK-клітинами цитокинів, секретованих у зразку цільної крові, з такою у здорової людини.
- 30 19. Спосіб за п. 1, де відстежують зміни активності NK-клітин.
20. Спосіб за п. 1, де стимулювання NK-клітин виконують шляхом інкубування зразка цільної крові з інтерлейкіном 2 або з інтерлейкіном 2 у вигляді химерного білка зі стабілізуючим пептидом.
21. Спосіб за п. 1, де стимулювання NK-клітин виконують шляхом інкубування зразка цільної крові з інтерлейкіном 15 або з інтерлейкіном 15 у вигляді химерного білка зі стабілізуючим пептидом.
- 35 22. Спосіб за п. 1, де щонайменше один стимулюючий цитокін знаходиться у формі химерного білка зі стабілізуючим пептидом, де химерний білок містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю стосовно амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, 8 або 10 або складається з неї.
- 40

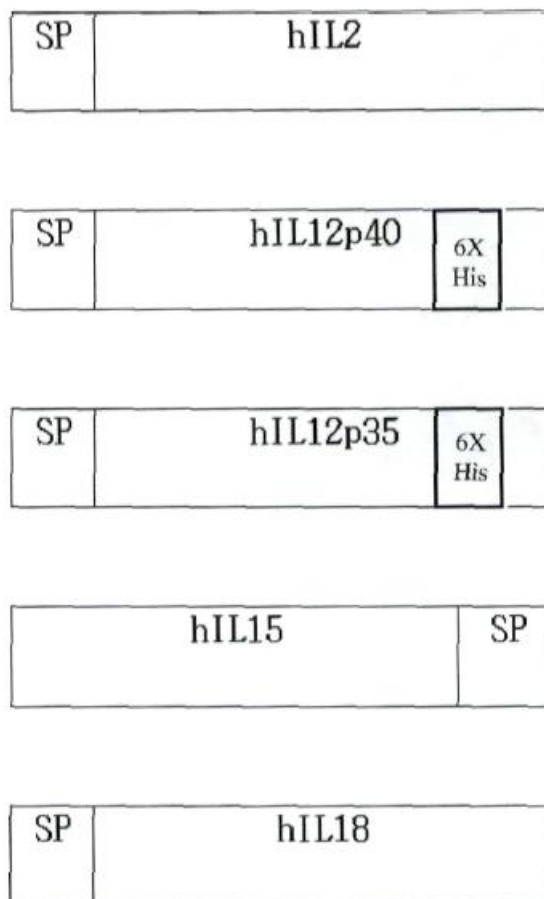


Fig. 1

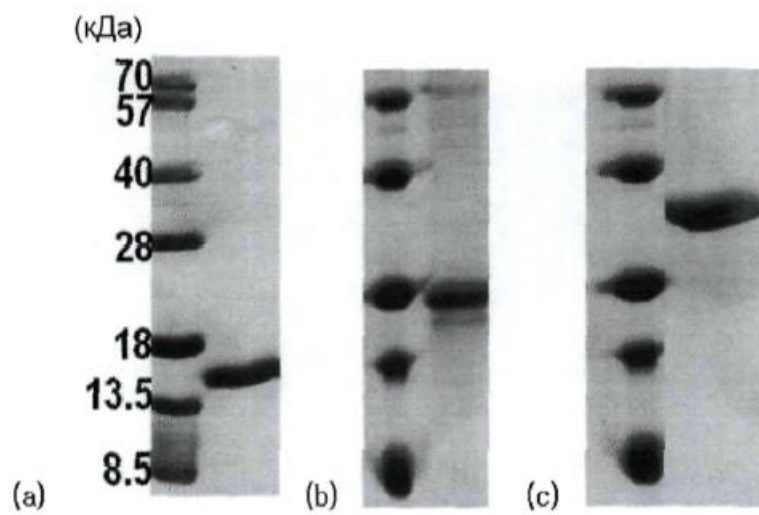
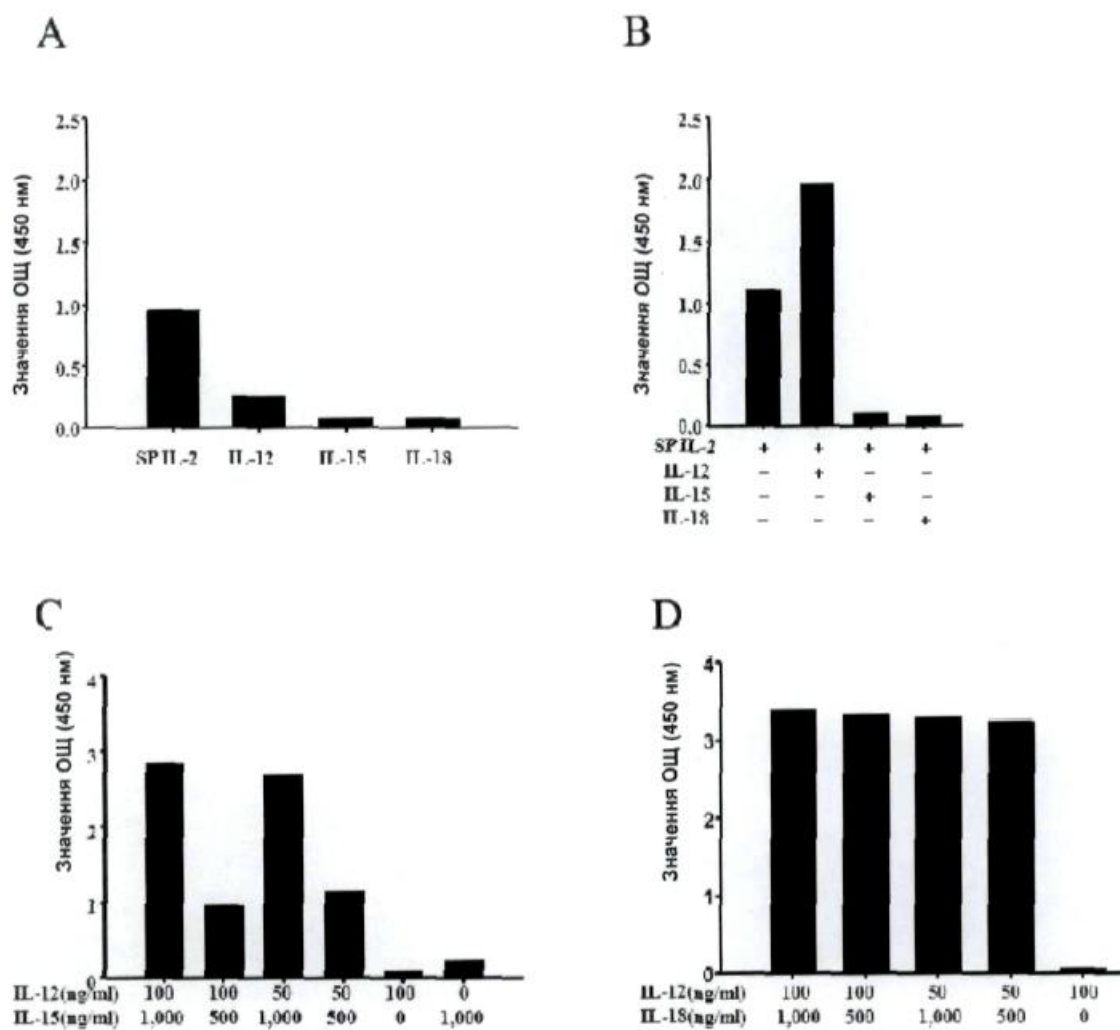
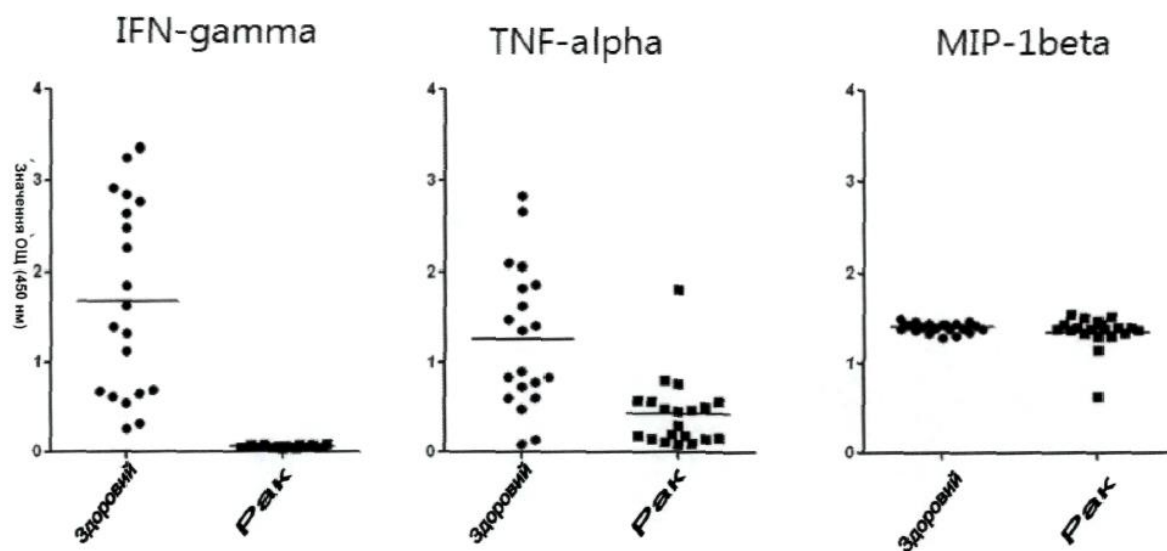


Fig. 2

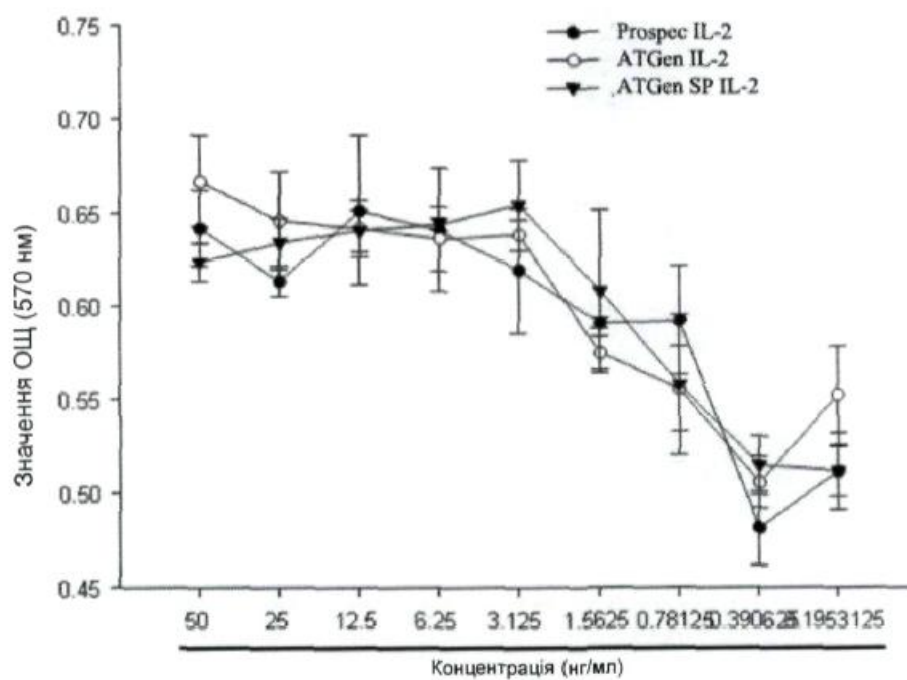


Фиг. 3



Фиг. 4

A



B

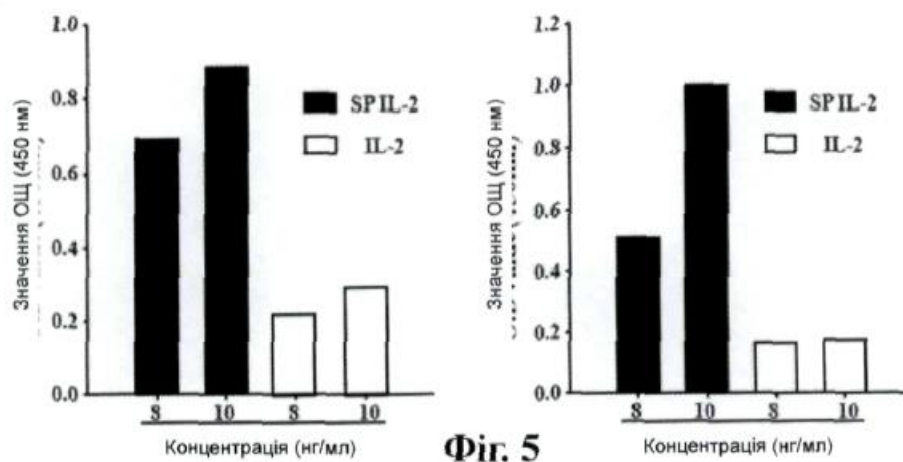
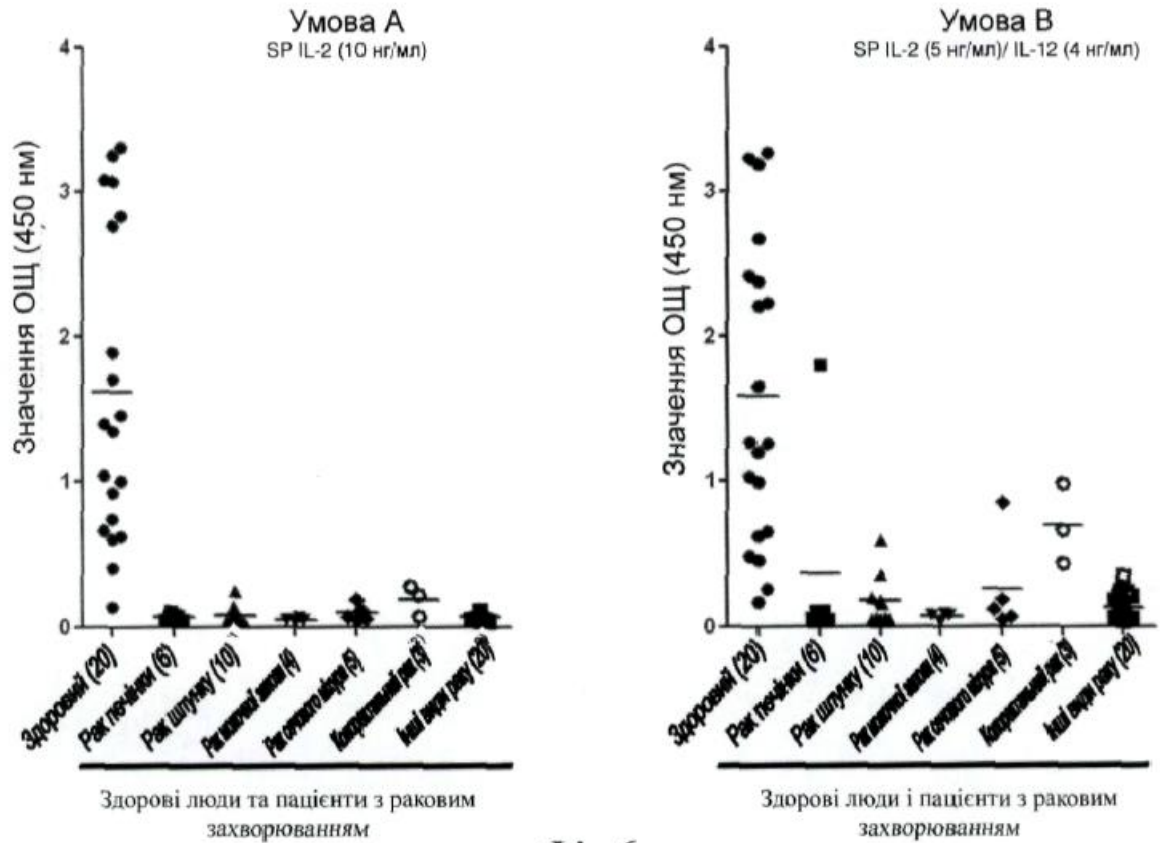
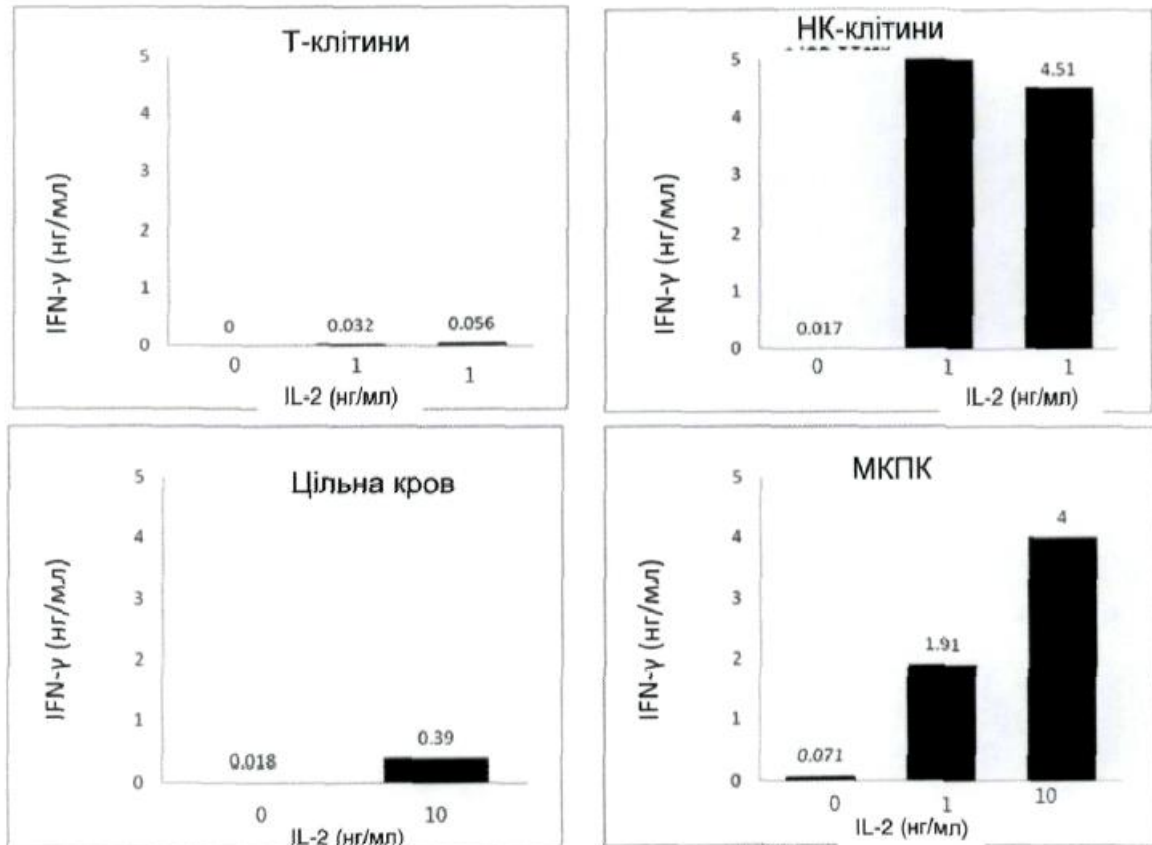


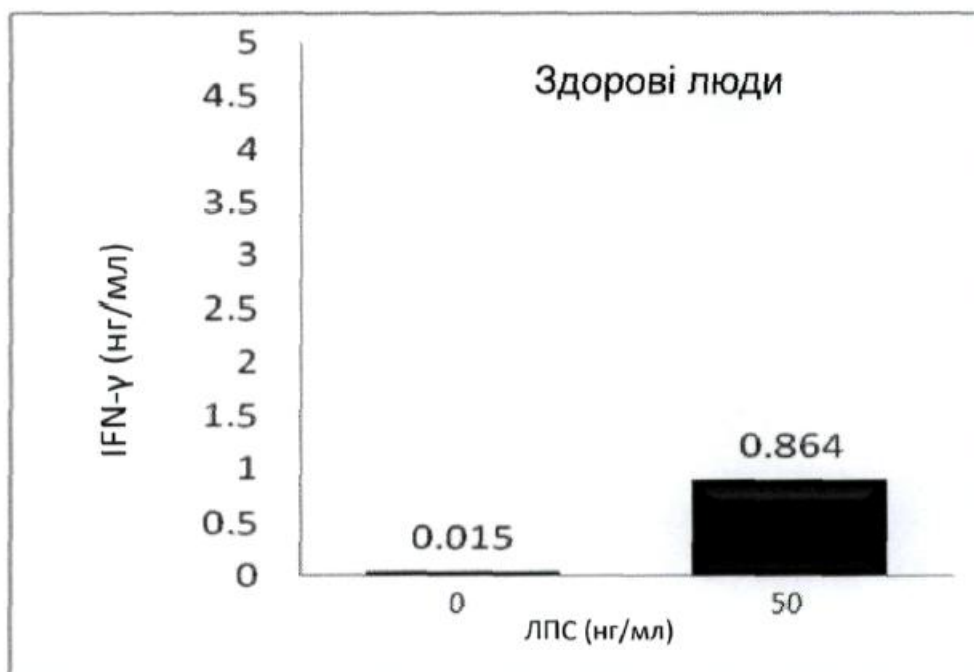
Fig. 5



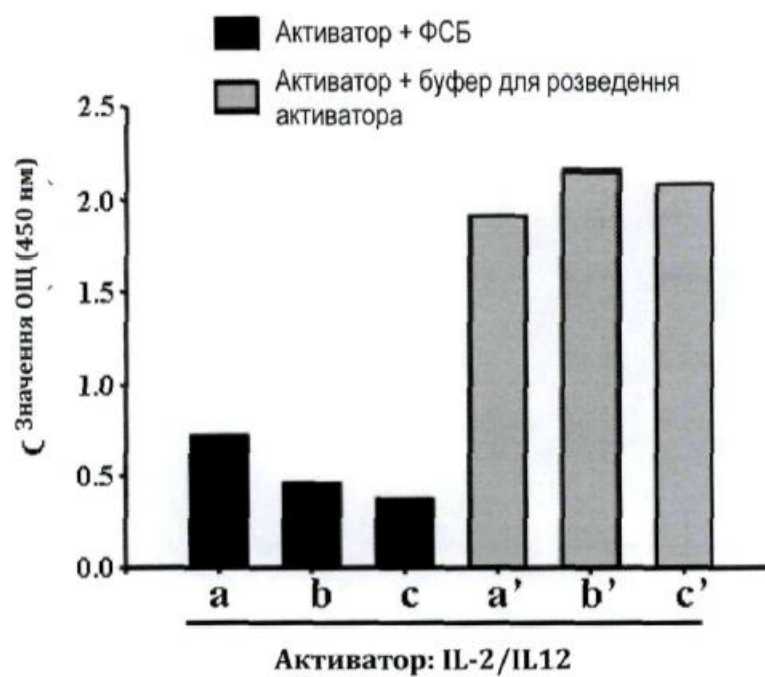
Фіг. 6



Фіг. 7



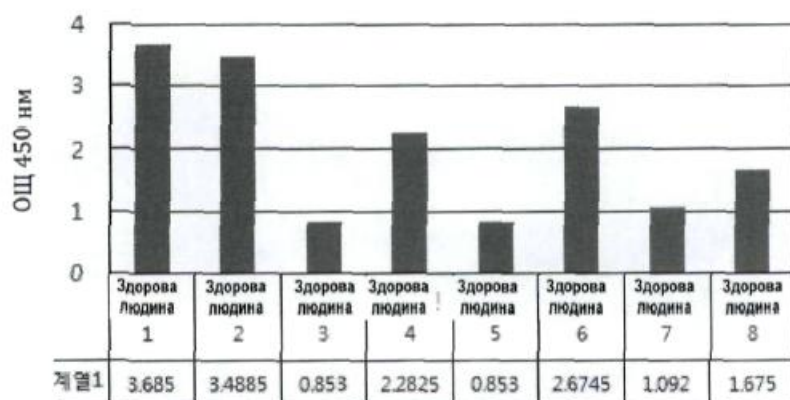
Фіг. 8



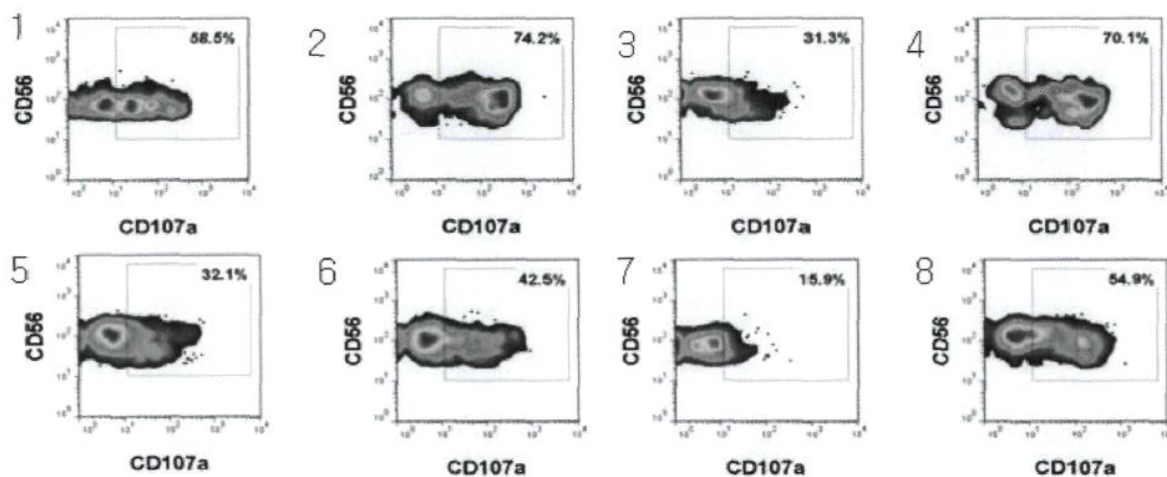
Фіг. 9



Фіг. 10



Фіг. 11



Фіг. 12

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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