



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104933** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
C07K 19/00
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2012 08633**
(22) Дата подання заявки: **26.02.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.03.2014**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **200910242838.0**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17.12.2009**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **27.08.2012, Бюл.№ 16**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2014, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/CN2010/070762, 26.02.2010**
(72) Винахідник(и): **Цю Сяоцин (CN)**
(73) Власник(и): **ПРОТЕІН ДИЗАЙН ЛЕБ, ЛТД., Qianshajian, Sujiatuo, Haidian District Beijing 100095, China (CN)**
(74) Представник: **Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Riley M.A., Tan Y., Wang J. "Nucleotide polymorphism in colicin E1 and Ia plasmids from natural isolates of Escherichia coli." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91:11276-11280.
@ UniParc:Q46736
Rosovitz M.J., Ravel J. Submitted (OCT-2007) to the EMBL/GenBank/DDBJ
databases.UniProtKB/TrEMBL:B3AT69. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE. Strain: EC4486 EMBL EDU78868.1
Schramm E et al: "Nucleotide sequence of colicin B activity gene CBA consensus pentapeptide among ton-B-dependent colicins and receptors", Journal of bacteriology, vol. 169, no. 7, 1987, p. 3350-3357
Riley Margaret A: "Molecular mechanisms of colicin evolution", Molecular biology and evolution, vol. 10, no. 6, 1993, p. 1380-1395
Geli V et al: "Recognition of the colicin A N-terminal epitope 1C11 in vitro and in vivo in Escherichia coli by its cognate monoclonal antibody", Fems microbiology letters, Wiley-Blackwell publishing LTD, GB, vol. 109, no. 2-3, 15.05.1993, p. 335-342
Cavard D et al: "A molecular, genetic and immunological approach to the functioning of colicin A, a pore-forming protein", Journal of molecular biology, Academic press, United Kingdom, vol. 187, no. 3, 5.02.1986, p. 449-459
Qiu Xiao-Qing et al: "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", Nature biotechnology, vol. 25, no. 8, 08.2007, p. 921-929
Ladner Robert Charles: "Antibodies cut down to size.", Nature biotechnology, 08.2007, vol. 25, no. 8, , p. 875-877
Zhen Zi-Peng et al: "Development of a novel small antibody that retains specificity for tumor targeting", Journal of experimental & clinical cancer research, Biomed central LTD, London UK, vol. 28, no. 1, 30.04.2009, p. 59
WO 2007083175 A1, 26.07.2007
US 2006233813 A1, 19.10.2006
US 2006193867 A1, 31.08.2006
CN 1641024 A, 20.07.2005

UA 104933 C2**(54) ЗЛИТИЙ ПОЛІПЕПТИД ПРОТИ ПУХЛИНИ, ІНДУКОВАНОЇ ВІРУСОМ ЕВ, І МУТАНТ КОЛІЦИНУ Ia**

(57) Реферат:

Винахід належить до злитого поліпептиду проти пухлини, індукованої вірусом EB, який включає антитіло або міметики антитіл проти вірусу EB і коліцин Ia, який включає мутації G11A, H22G, A26G, V31L і H40D.

Область винаходу

Дійсний винахід відноситься до області протипухлинних засобів, і, більш конкретно, до нового поліпептиду проти пухлини, викликаної вірусом EB (Епштейна-Барра), і його застосування, і способу отримання.

5 Область техніки, якої стосується дійсний винахід

В області вивчення антибіотиків дослідження спрямовані на розробку нових антибіотиків, які відтворюють механізм взаємного кіллінгу між гомогенними гетерологічними штамми. У природі існує велика кількість бактеріальних токсинів, які знищують клітини шляхом безпосереднього утворення іонних каналів у клітинній мембрані бактерій. Показовим прикладом такого токсину є коліцин, бактеріальний токсин, що секретується *E. coli*. Коліцин Ia виявив Jacob у 1952 році, відтоді за допомогою старанної праці поколінь Qiu і співавт. (Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J. Gen. Physiology*, 107:313-328 (1996)) зрештою відкрили трансмембранну просторову структуру коліцину Ia за відкритих або закритих іонних каналів, утворених у штучних двошарових ліпідних мембранах, що на молекулярному рівні забезпечує фундаментальну основу для розробки і отримання нових антибіотиків. Як наслідок, існують поліпептидні молекули, створені шляхом з'єднання поліпептиду коліцину із сигнальним пептидом, таким як феромони *Streptococcus albus* або роду *Staphylococcus*, які націлюють коліцин на клітинну мембрану бактерії, що цікавить, і знищують клітину внаслідок витоку клітинного вмісту через утворені трансмембранні іонні канали.

Злоякісна пухлина являє собою серйозну загрозу для здоров'я людини. Щорічно від злоякісної пухлини у світі помирають сім мільйонів людей, одна шоста з яких у Китаї. У нашій країні злоякісна пухлина зараз є другою за значимістю причиною смерті. Оскільки етіологія, патогенез і клінічний прояв злоякісної пухлини чітко не з'ясовані, профілактика та лікування не є ефективними. Протипухлинні засоби важливі для лікування пухлини. Незважаючи на те, що вони досягають терапевтичного ефекту стосовно деяких пухлин, залишаються деякі недоліки, такі як недостатня пухлинна селективність, імунологічне пригнічення, побічна реакція, стійкість до лікарських засобів і т.д.

Поверхня клітин лімфоми Беркітта, лімфоми Ходжкіна і назофарингіальної карциноми, викликаних вірусом Епштейна-Барра (EB), несе специфічний поверхневий антиген вірусу EB. Таким чином, поверхневий антиген вірусу EB може бути розглянутий у якості специфічного маркера таких пухлинних клітин. Відносно засобів проти пухлини, викликані вірусом EB, винахід з патентом Китаю № ZL200410081446.8 розкриває протипухлинний поліпептид, утворений шляхом кон'югації коліцину і міметиків антитіл, які розпізнають поверхневий антиген вірусу EB. Протипухлинний поліпептид здатний специфічно знищувати в організмі ракові клітини, викликані вірусом EB, не шкодить нормальним клітинам, його здатність до кіллінгу в кілька разів вище, ніж у інших протипухлинних засобів, і він долає проблеми, такі як пухлинна селективність, стійкість до лікарських засобів, ураження нормальної тканини при знищенні ракових клітин. Xiao-Qing Qiu і співавт. (Xiao-Qing Qiu et al., 2007, Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting, *Nature Biotechnology* 25, 921-929, 1 August 2007) порівняли ефект кіллінгу протипухлинних поліпептидів, сконструйованих за допомоги ряду міметиків антитіл і коліцину, і виявили, що протипухлинні поліпептиди, сконструйовані за допомоги міметиків антитіл VHCDR1-VHFR₂-VLCDR3 і VLCDR1-VHFR₂-VHCDR3 і коліцину мають чудову здатність до кіллінгу. Ця робота забезпечує більше ймовірних міметиків антитіл для отримання поліпептидів проти пухлини, викликані вірусом EB.

Однак відносно протипухлинного поліпептиду, описаного вище, через те, що гідрофобний кінець коліцину має кілька амінокислотних залишків, які можуть включати гіперчутливість, ліки, що містять поліпептид коліцину, більшою мірою здатні викликати ненормальну імунну відповідь *in vivo*. Повідомляли, що механізм обміну речовин багатьох пацієнтів, хворих на рак, є ненормальним через порушення, викликані раковими клітинами, вони схильні страждати алергічною реакцією на ліки з поліпептидів, тому не можуть лікуватися подібними ліками. Таким чином, необхідно поліпшити поліпептид коліцину для того, щоб одержати протиракові ліки, які є більш безпечними і придатними для більшого числа пацієнтів.

Короткий опис винаходу

Грунтуючись на недоліках прототипу, викладених вище, дійсний винахід забезпечує новий поліпептид проти пухлини, викликані вірусом EB, і його застосування, і спосіб отримання, таким чином, забезпечує ліки для лікування пухлини, викликані вірусом EB, які мають високу здатність до кіллінгу, високу специфічність і низьку ймовірність алергічної реакції.

Новий поліпептид проти пухлини, викликані вірусом EB, котрий утворюють шляхом функціонального зв'язування мутантного поліпептиду коліцину, здатного утворювати іонні

канали, з поліпептидом антитіла до вірусу EB або поліпептидом міметиків антитіл до вірусу EB, при чому мутантний поліпептид коліцину, що здатний утворювати іонні канали, одержують шляхом мутації амінокислотних залишків G11A, H22G, A26G, V31L і H40D у пептидному ланцюгу коліцину дикого типу E1, Ia, Ib, A, B, N або їх доменів водних каналів, при чому

5 амінокислотна послідовність поліпептиду антитіла до вірусу EB є тією ж, що у поліпептиді моноклонального антитіла, секретованого гібридомою ATCC HB-168.

Поліпептид міметиків антитіл являє собою з'єднаний пептид регіону CDR1 важкого ланцюга, зв'язувальний пептидний сегмент CDR1-CDR2 важкого ланцюга і CDR3 легкого ланцюга антитіла до вірусу EB.

10 Мутантний поліпептид коліцину, здатний утворювати іонні канали, одержують шляхом мутації коліцину Ia дикого типу.

Новий поліпептид проти пухлини, викликаної вірусом EB, має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO. 29.

Ген, що кодує новий поліпептид проти пухлини, викликаної вірусом EB.

15 Ген, який має нуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO. 30.

Рекомбінаційна плазміда, що містить зазначений ген.

Спосіб отримання нового поліпептиду проти пухлини, викликаної вірусом EB, що включає етапи, на яких: трансформують зазначену рекомбінаційну плазмиду в експресійну систему для експресії і виділяють експресований поліпептид.

20 Застосування зазначеного нового поліпептиду проти пухлини, викликаної вірусом EB, для отримання ліків для лікування і профілактики пухлини, викликаної вірусом EB.

Мутантний поліпептид коліцину Ia, його амінокислотна послідовність показана в SEQ ID NO. 24.

Ген, що кодує мутантний поліпептид коліцину Ia.

25 Застосування зазначеного гена для отримання пептидних ліків, функціонального зв'язування зазначеного гена з геном, який індукуює пептид, клонування в експресійний вектор, потім трансформування експресійного вектора в експресійну систему і виділення експресованого поліпептиду.

Дійсний винахід забезпечує новий поліпептид проти пухлини, викликаної вірусом EB, який утворений мутантним поліпептидом коліцину, здатним утворювати іонні канали, з поліпептидом антитіла до вірусу EB або поліпептидом міметиків антитіл до вірусу EB. Оскільки в молекулі поліпептиду коліцину дикого типу існують кілька амінокислотних залишків, які можуть включати гіперчутливість, згідно із дійсним винаходом в поліпептидній молекулі коліцину, здатного утворювати конструкт іонного каналу, селективно мутують амінокислотні залишки в гідрофобній області, які більшою мірою можуть викликати алергічну реакцію. Наприклад, у переважному варіанті здійснення дійсного винаходу мутантними сайтами поліпептиду коліцину Ia є: G11A, H22G, A26G, V31L і H40D. У мишей, імунізованих ін'єкцією поліпептиду коліцину Ia або поліпептиду мутантного Ia, відповідно, експериментальні дані показують, що сироватковий титр, продукований мишами, ін'єктованими поліпептидом мутантного Ia, на кілька порядків величини

40 нижче, ніж попередній, тобто, рівень імунної відповіді нижче, що доводить, що мутантний поліпептид знижує ймовірність алергії, у той час як мутантний поліпептид зберігає функцію утворення іонних каналів у мембрані клітини. Експеримент показав, що здатність до кіллінгу рекомбінантного поліпептиду дійсного винаходу не порушена, що означає, що мутантні амінокислотні залишки не порушують функцію утворення коліцином іонних каналів. У новому

45 поліпептиді проти пухлини, викликаної вірусом EB, забезпеченому дійсним винаходом, мутантний поліпептид коліцину націлюють на мембрану клітин-мішеней за допомогою розпізнавання поліпептидом антитіла до вірусу EB або поліпептидом міметиків антитіл до вірусу EB поверхневого антигену пухлинних клітин, викликаних вірусом EB, гідрофобний регіон трансмембранного домену іонного каналу мутантного поліпептиду коліцину вставляють у

50 клітинну мембрану пухлинних клітин з утворенням іонного каналу, таким чином, пухлинні клітини гинуть від витоку клітинного вмісту. Амінокислотна послідовність поліпептиду антитіла до вірусу EB повністю відноситься до амінокислотної послідовності поліпептиду антитіла, секретованого гібридомою ATCC HB-168.

У варіанті здійснення дійсного винаходу переважним є протипухлинний поліпептид даного винаходу з низькою молекулярною вагою, який одержують шляхом функціонального зв'язку поліпептиду міметиків антитіл до вірусу EB, описаних вище, з карбоксильним кінцем мутантного поліпептиду коліцину. Тобто, такий міметичний поліпептид з низькою молекулярною вагою містить пептидний ланцюг VHCDR1-VHFR2-VLCDR3, який одержують шляхом з'єднання регіону VHCDR1, регіону VLCDR3, зв'язувального пептидного сегмента VHCDR1-VHCDR2 і VLCDR3

60 легкого ланцюга поліпептиду антитіла до вірусу EB. Амінокислотна послідовність міметиків

антитіл нового протипухлинного пептиду 1 показана в SEQ ID NO. 25. Міметик антитіл містить тільки менше 30 амінокислот і має молекулярну вагу набагато нижче, ніж природне антитіло із 150 амінокислот. Він виконує вимогу розпізнавання антигену, у той час як значно знижує молекулярну вагу протипухлинного поліпептиду і сприяє тканинній проникності протипухлинного поліпептиду дійсного винаходу.

Іншою метою дійсного винаходу є забезпечення послідовності гену, що кодує протипухлинний поліпептид дійсного винаходу. Ген протипухлинного поліпептиду дійсного винаходу утворений шляхом функціонального зв'язку гена, що кодує мутантний поліпептид коліцину, з геном, що кодує поліпептид антитіла до вірусу EB або поліпептид міметиків його антитіл, де поліпептид коліцину і генна послідовність антитіла до вірусу EB відомі в даній області техніки, ген мутантного поліпептиду коліцину одержують шляхом наступних крапкових мутацій у відповідних кодонах гена поліпептиду коліцину: G11A, H22G, A26G, V31L і H40D. Завдяки виродженості генетичного коду фахівець у даній області техніки може регулювати нуклеотидну послідовність, що кодує протипухлинний поліпептид дійсного винаходу, без зміни амінокислотної послідовності.

Рекомбінаційна плазмідна дійсного винаходу означає, що вихідний вектор, завантажений геном коліцину дикого типу, сайт-спрямовано мутують у подвійному нуклеотидному ланцюгу і вставляють мутантними кодонами в сайт спрямованої мутації, у такий спосіб одержуючи мутантний вектор, що містить ген мутантного поліпептиду коліцину. Таким же процесом сайт-спрямованого мутагенезу вставляють ген, що кодує міметики антитіл до антитіла до вірусу EB, у ділянку гена, що кодує карбоксильний кінець мутантного поліпептиду коліцину, у такий спосіб одержуючи рекомбінантну плазмідну дійсного винаходу. Вихідний вектор pSELECT™-1, придбаний в Promega Corp., несе гени коліцину Ia і білка імунітету. Процес сайт-спрямованого мутагенезу виконують згідно з інструкцією до набору від Strategene Corp. Згідно з дійсним винаходом проводять декілька сайт-спрямованих мутагенезів для одержання мутантного поліпептиду коліцину, де п'ять кодонів є мutowаними сайт-спрямовано. Таким чином, сконструювали 5 пар праймерних послідовностей (SEQ ID NO. 1-10). У прикладі дійсного винаходу 6 пар праймерних послідовностей сконструювали для гена міметиків антитіл. (SEQ ID NO. 11-22).

Дійсний винахід також забезпечує спосіб отримання протипухлинного поліпептиду дійсного винаходу, який включає трансформування одержаного вище рекомбінантного вектора в бактерії BL21(DE3) E. coli, що модифікуються, відбір позитивного клону, виділення і очищення експресованого позитивним клоном білка, у такий спосіб одержуючи новий поліпептид дійсного винаходу проти пухлини, викликаной вірусом EB.

Новий поліпептид проти пухлини, викликаной вірусом EB, забезпечений дійсним винаходом, може бути використаний для отримання ліків для лікування або профілактики пухлини, викликаной вірусом EB. Клінічно придатна фармацевтична композиція може бути створена шляхом додавання поліпептиду нових антибіотиків, одержаних згідно із дійсним винаходом, у фармацевтично прийнятний носій або середовище або інші додаткові компоненти.

Дійсний винахід також забезпечує амінокислотну послідовність і нуклеотидну послідовність гена мутантного поліпептиду коліцину Ia. У дійсному винаході може бути використаний мутантний поліпептид, який також може бути використаний при конструюванні поліпептиду антитіла з іншими націлюючими поліпептидами. Експериментальні дані прикладу 3 дійсного винаходу підтверджують, що пептидні ліки, що містять мутантний поліпептид, мають низьку імуногенність, і, що поліпептид антитіла, утворений мутантним поліпептидом з іншим націлюючим поліпептидом, має бактерицидну здатність. Спосіб отримання є звичайним експериментальним процесом у даній області техніки.

Новий протипухлинний поліпептид, забезпечений дійсним винаходом, має перевагу над протипухлинним поліпептидом, розкритим у патенті № ZL200410081446.8, тобто, високоспецифічне націлювання і безпечність для нормальних клітин, і відсутність схильності до розвитку стійкості до лікарських засобів. У той же час протипухлинний поліпептид дійсного винаходу мutowаний за тими амінокислотними залишками, які, як правило, викликають алергічну відповідь, при цьому імуногенність протипухлинного поліпептиду, що містить такий мутантний поліпептид, знижена, тобто, знижена ймовірність алергічної реакції. Поліпшені безпечність застосування і ефект кіллінгу пухлини ліками з таких поліпептидів. Це також може бути хорошим прикладом для поліпшення інших ліків, що містять поліпептид коліцину.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1. Схематична ілюстрація структури рекомбінантної плазмиди pCHCEB11, яка містить ген поліпептиду міметиків антитіл VHCDR1-VHFR₂-VLCDR3 і ген мутантного поліпептиду коліцину Ia.

Фігура 2. Схематична ілюстрація структури рекомбінантної плазмід рCHCEB22, яка містить ген поліпептиду міметиків антитіл VHCDR1-VHFR₂(Rev)VLCDR3 і ген мутантного поліпептиду коліцину Ia.

5 Фігура 3. Експеримент 1 по вивченню сенсibiliзуючого ефекту мутантного поліпептиду коліцину Ia.

(A) Мишей Kunming, яким внутрішньочеревинно ін'єктують летальну дозу MRSA (ATCC BAA42), групують випадковим чином в (1) контрольну групу, (2) групу ампіциліну, (3) групу поліпептиду проти *S. aureus* (ZL 01128836.1), (4) групу поліпептиду 1 проти *S. aureus*.

10 (B) Через 14 днів нову партію мишей Kunming групують у контрольну групу і групу ампіциліну. Мишей, що вижили, із групи поліпептиду проти *S. aureus* і групи поліпептиду 1 проти *S. aureus* групують у групу поліпептиду проти *S. aureus* і групу поліпептиду 1 проти *S. aureus*, і експеримент повторюють.

15 (C) Через 41 день нову партію мишей Kunming групують в (1) контрольну групу, (2) групу левофлоксацину, (3) групу цефтриаксону натрію, (4) групу поліпептиду проти *S. aureus*, і (5) мишей, що вижили, із групи поліпептиду 1 проти *S. aureus* групують у групу поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* і групу поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*.

Фігура 4. Експеримент 2 по вивченню низького сенсibiliзуючого ефекту мутантного поліпептиду коліцину Ia.

20 (A) сироватка крові групи поліпептиду проти *S. aureus*/поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa*, титр 1:50000;

(B) сироватка крові групи поліпептиду 1 проти *S. aureus*/поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*, титр 1:50000.

(1) 1 тиждень, (2) 2 тиждень, (3) сироватка крові 7 тижня, (4) негативний контроль.

25 Фігура 5. Порівняння ефекту кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду *in vitro* щодо лімфоми Беркітта, викликаній вірусом EB.

(A) контрольна група, (B) група, піддана впливу нового протипухлинного поліпептиду 1, (C) група, піддана впливу нового протипухлинного поліпептиду 2.

Фігура 6. Ефект кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду *in vitro* щодо клітин лімфоми Беркітта, викликаній вірусом EB, і інших пухлинних клітин.

30 (A) EBV-позитивні клітини лімфоми Беркітта,

(B) EBV-негативні клітини лімфоми Беркітта,

(C) EBV-позитивні клітини злоякісної лімфосаркоми від хворого на СНІД пацієнта.

(1) контрольна група, (2) група, піддана впливу нового протипухлинного поліпептиду 1.

35 Фігура 7. Ефект кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду щодо солідної пухлини, вирощеної в голих мишей з підсадженими клітинами лімфоми Беркітта, викликаній вірусом EB.

(A) контрольна група.

(B) SCID імунodefіцитні миші із групи, підданої впливу нового протипухлинного поліпептиду 1, усі інokульовані клітинами лімфоми Беркітта в обидві пахвові бічні поверхні. Стрілка ліворуч указує EBV-негативну лімфосаркому, стрілка праворуч указує EBV-позитивну лімфосаркому.

40 Фігура 8. Ефект кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду щодо солідної пухлини, вирощеної в голих мишей з підсадженими клітинами лімфоми Беркітта, викликаній вірусом EB.

(A) зріз EBV-негативної лімфосаркоми контрольних мишей, (B) зріз EBV-позитивної лімфосаркоми контрольних мишей, (C) зріз EBV-негативної лімфосаркоми мишей, підданих впливу нового протипухлинного поліпептиду 1, (D) зріз EBV-позитивної лімфосаркоми мишей, підданих впливу нового протипухлинного поліпептиду 1.

Варіанти здійснення

Дійсний винахід тепер буде описано за допомогою опису переважних варіантів здійснення дійсного винаходу з посиланням на супровідні графічні матеріали.

50 Вихідний вектор рSELECTTM-1, використаний у дійсному винаході, придбаний в Promega Corp.

Бактерії BL21(DE3) *E. coli*, що модифікуються, придбані в Novagen Corp.

Приклад 1. Конструювання рекомбінантної плазмід, що містить ген, що кодує мутантний коліцин Ia.

55 Вихідний вектор являє собою плазмід рSELECTTM-1 (8,3 т.п.о) (придбана в Promega Corp.), яка несе гени коліцину Ia і білка імунітету. Послідовності олігонуклеотидних праймерів, показані в SEQ ID NO. 1-10, які кодують мутантні амінокислоти, функціонально зв'язують із геном коліцину Ia дикого типу, відповідно, шляхом техніки сайт-спрямованого мутагенезу подвійного олігонуклеотидного ланцюга (QuickchangeTM Kit, Stratagene Corp.), одержуючи ген, показаний в SEQ ID NO. 23, який кодує мутантний поліпептид коліцину Ia, і мутантну плазмід. Після цього

60 ген з SEQ ID NO. 26 або SEQ ID NO. 28 вставляють у мутантну плазмід після кодону з гена

I626 мутантного поліпептиду коліцину Ia, одержуючи дві рекомбінантні плазмиди pCHCEB11 (показана на Фігурі 1) і pCHCEB22 (показана на Фігурі 2) для нового поліпептиду проти пухлини, викликаной вірусом EB. Послідовності 6 пар олігонуклеотидних праймерів, які сконструйовані для отримання в рекомбінантній плазміді гена, що кодує антитіло проти вірусу EB, показані в SEQ ID NO. 11-22. Рекомбінаційну плазмиду трансфікували в бактерію BL21(DE3) *E. coli*, що модифікується (придбана в Novagen Corp.), для отримання поліпептиду. У переліку послідовностей одержані поліпептиди показані в SEQ ID NO. 29 (що надалі іменується "новий протипухлинний поліпептид 1") і SEQ ID NO. 31 (що надалі іменується "новий протипухлинний поліпептид 2") в переліку послідовностей.

Процес сайт-спрямованого мутагенезу подвійного олігонуклеотидного ланцюга виконують згідно Strategene Quickchang Site-Directed Mutagenesis Kit (кат. № 200518).

1. Приготування реактивів для сайт-спрямованого мутагенезу:

5 мкл 10X буфера

2 мкл (10 нг) вихідної плазмиди pSELECTTM-1, яка несе гени поліпептиду коліцину Ia дикого типу і білка імунітету.

1,25 мкл (125 нг) сконструйованого 5'-3' олігонуклеотидного праймера

1,25 мкл (125 нг) сконструйованого 3'-5' олігонуклеотидного праймера

1 мкл дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфатів)

двічі дистильована вода 50 мкл

1 мкл *rfu*

(забезпечено набором, крім плазмиди, праймерів і двічі дистильованої води)

2. ПЛР ампліфікація, умови ампліфікації: 25 циклів денатурації при 95 °C протягом 35 секунд, відпал при 53 °C протягом 70 секунд і подовження при 68 °C протягом 17 хвилин;

3. 1 мкл ендонуклеази Dpn 1 додають для розщеплення батьківського ланцюга ДНК (37 °C, 1 година), 1 мкл реагента і 50 мкл компетентних клітин XL1-blue спільно інкубують на льоду протягом 30 хвилин, потім, після теплового шоку при 42 °C протягом 45 секунд, інкубують на льоду протягом 2 хвилин;

4. 0,5 мл культурального середовища NZY додають, перемішуючи протягом 1 години при 37 °C і 220 об./хв. 50-100 мкл реагента висівають на чашку Петрі (середовище LB плюс 1 % агар і 50 мкг/мл ампіциліну, протягом ночі при 37 °C);

5. Колонію відбирають через 18 годин. Плазмиду екстрагують, секвенують, підтверджуючи успішність мутування;

6. 50 нг рекомбінаційної плазмиди, зрештою одержаної шляхом мутування по декількох сайтах, інкубують з 40 мкл компетентних клітин BL-21(DE3) *E. coli* на льоду протягом 5 хвилин, піддають тепловому шоку при 42 °C протягом 30 секунд і інкубують у льоду протягом 2 хвилин. Додають 160 мкл культурального середовища SOC від Novagen scorp. і після перемішування протягом 1 години при 37 °C і 220 об./хв. висівають на чашку Петрі (LB середовище плюс 1 % агар і 50 мкг/мл ампіциліну, протягом ночі при 37 °C).

7. Одиночну колонію відбирають для ампліфікації, додають 8-16 літрів середовища FB, перемішують при 250 об./хв. і 30 °C протягом 4-5 годин, піддають тепловому шоку при 42 °C і 250 об./хв. протягом 30 хвилин і при 37 °C протягом 2 годин. Бактерії осаджують центрифугуванням при 6000 g і 4 °C протягом 20 хвилин. До 50 ммоль/л боратного буфера (2 ммоль/л EDTA +2 ммоль/л DTT) і 50-80 мл бактеріальної суспензії при 4 °C додають 250 мл 0,2 моль/л PMSF і піддають впливу ультразвуку (4 °C, 400 Вт, 2 хвилини). Бактеріальний детрит центрифугують при високій швидкості (4 °C, 75000 g, 90 хвилин). До надосадової рідини додають 5 млн. умовних одиниць стрептоміцин сульфату для осадження ДНК. Після осадження центрифугуванням при 15000 g і 4 °C протягом 10 хвилин надосадову рідину діалізують протягом ночі в діалізному мішку для молекулярної ваги 15000 в 50 ммоль/л боратного буфера при 4 °C. Після повторного осадження центрифугуванням при 15000 g і 4 °C протягом 10 хвилин, надосадову рідину завантажують в іонообмінну колонку CM. Колонку елюють з використанням градієнта 0,1-0,3 моль/л NaCl + 50 ммоль/л боратного буфера, одержуючи рекомбінантний протипухлинний поліпептид.

Послідовності праймерів, сконструйованих для сайт-спрямованого мутагенезу, є наступними:

SEQ ID NO.1, 5'-3' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації G11A у гені коліцину:

cgt att aca aat ccc GCA gca gaa tcg ctg ggg

SEQ ID NO.2, 3'-5' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації G11A у гені коліцину:

ccc cag cga ttc tgc TGC ggg att tgt aat acg

SEQ ID NO.3, 5'-3' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації H22G у гені коліцину:

gat tca gat ggc GGT aaa tta tgg gtg

5 SEQ ID NO.4, 3'-5' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації H22G у гені коліцину:

cac cca taa ttt ACC gcc atc tga atc

SEQ ID NO.5, 5'-3' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації A26G у гені коліцину:

gaaa ttatgggtgt tgatatttat

10 SEQ ID NO.6, 3'-5' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації A26G у гені коліцину:

ataaatatacaacacccataatttc

SEQ ID NO.7, 5'-3' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації V31L у гені коліцину:

gt tgatatttat CTC aaccctc cacgtgtc

15 SEQ ID NO.8, 3'-5' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації V31L у гені коліцину:

gacacgtggagggttgagataaatatcaac

20 SEQ ID NO.9, 5'-3' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації H40D у гені коліцину:

cggtgtcga tgtctttgatgtaccccgcc ctgcat

SEQ ID NO.10, 3'-5' олігонуклеотидний праймер, сконструйований для мутації H40D у гені коліцину:

atgcaggcggggtaccatcaaagacatcgacacg

25 SEQ ID NO.11, 5'-3' праймер для гена V_HCDR1 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG Cgtcagtaa ata aaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.12, 3'-5' праймер для гена V_HCDR1 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc

SEQ ID NO.13, 5'-3' праймер для гена V_HFR₂ у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

30 ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ata aaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.14, 3'-5' праймер для гена V_HFR₂ у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc

35 SEQ ID NO.15, 5'-3' праймер для гена (Rev)V_LCDR3 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc ACC TAC CCC TAC TCC TAC GGT CAG GGT taa ata aaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.16, 3'-5' праймер для гена (Rev)V_LCDR3 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB11:

gcc tgt ctt ata ttt tat tta ACC CTG ACC GTA GGA GTA GGG GGT ggc cac cca ctc cag acc ttt

40 SEQ ID NO.17, 5'-3' праймер для гена V_HCDR1 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG CGT CAG taa ata aaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.18, 3'-5' праймер для гена V_HCDR1 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc

45 SEQ ID NO.19, 5'-3' праймер для гена V_HFR₂ у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ataaaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.20, 3'-5' праймер для гена V_HFR₂ у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc

50 SEQ ID NO.21, 5'-3' праймер для гена V_LCDR3 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc GGT CAG GGT TAC TCC TAC CCC TAC ACC taa ata aaa tat aag aca ggc

SEQ ID NO.22, 3'-5' праймер для гена V_LCDR3 у рекомбінаційній плазміді pCHCEB22:

55 gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGT GTA GGG GTA GGA GTA ACC CTG ACC ggc cac cca ctc cag acc ttt

Приклад 2. Спостереження імунного ефекту нових протипухлинних поліпептидів, отриманих із застосуванням рекомбінаційних плазмід pCHCEB11 і pCHCEB22.

Мишей імунізують новим протипухлинним поліпептидом 1 і новим протипухлинним поліпептидом 2, отриманим із застосуванням рекомбінаційних плазмід pCHCEB11 і pCHCEB22, одержаних у Прикладі 1, і протипухлинним поліпептидом 1 і протипухлинним поліпептидом 2 з

попереднього винаходу, що належить винахіднику (ZL200410081446.8). Кожний білок, описаний вище, змішують з допоміжною речовиною. Посилена початкова доза і стимулююча доза являють собою одну внутрішньочеревинну ін'єкцію кожній миші 50 мкг (0,5 мл), всього п'ять ін'єкцій з 2-тижневим інтервалом. Сироватковий титр визначають непрямим способом ELISA.

5 Титр у мишей, імунізованих новими протипухлинними поліпептидами 1 і 2, отриманими згідно із дійсним винаходом, знаходиться в діапазоні від 10^{-3} до 10^{-4} , у той час як титр у мишей, імунізованих протипухлинним поліпептидом 1 і протипухлинним поліпептидом 2, знаходиться в діапазоні від 10^{-4} до 10^{-5} .

Очевидно, що ймовірність реакції гіперчутливості, індукованої новим протипухлинним поліпептидом дійсного винаходу, є на 1-2 порядки величини нижчою, ніж ймовірність реакції гіперчутливості, індукованої протипухлинним поліпептидом, що містить коліцин Ia дикого типу.

Приклад 3. Експеримент по вивченню низького сенсibiliзуючого ефекту мутантного поліпептиду коліцину Ia, який утворює новий протипухлинний поліпептид.

Мутантну плазмиду для мутантного поліпептиду коліцину Ia (який мутований за амінокислотними залишками G11A, H22G, A26G, V31L і H40D у пептидному ланцюгу домену водного каналу) із Прикладу 1 функціонально зв'язують із феромоном AgrD1(YSTCDFIM) *S. aureus* N-кінцем або C-кінцем мутантного поліпептиду, одержуючи два антибактеріальних поліпептида. Поліпептид, одержаний шляхом зв'язування AgrD1 з карбоксильним кінцем мутантного коліцину Ia, називають як поліпептид 1 проти *S. aureus*, і поліпептид, одержаний шляхом зв'язування Agrd1 з амінокінцем мутантного коліцину Ia, називають як поліпептид 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*. Плазмиду для коліцину Ia дикого типу зв'язують на амінокінці з феромоном AgrD1(YSTCDFIM) *S. aureus*, одержуючи поліпептид 2 проти *Pseudomonas aeruginosa*.

Експеримент 1: Партію мишей Kunming внутрішньочеревинно ін'єктують летальною дозою MRSA (ATCC BAA42) і групують випадковим чином в (1) контрольну групу, (2) групу ампіциліну, (3) групу поліпептиду проти *S. aureus*, (4) групу поліпептиду 1 проти *S. aureus*. Кожна група складається з 10 мишей.

Спосіб обробки:

Через одну годину після внутрішньоочеревинної ін'єкції летальної дози MRSA (ATCC BAA42):

контрольна група: однократно ін'єктують 0,5 мл 0,3 моль/л NaCl + 50 ммоль/л боратного буфера у хвостову вену;

група ампіциліну: однократно ін'єктують 2,5 мг/кг ампіциліну у хвостову вену;

група поліпептиду проти *S. aureus*: однократно ін'єктують 6 мг/кг поліпептиду проти *S. aureus*, що належить винахіднику (ZL 01128836.1), у хвостову вену;

група поліпептиду 1 проти *S. aureus*: однократно ін'єктують 6 мг/кг поліпептиду 1 проти *S. aureus* у хвостову вену;

Результат: Усі миші в контрольній групі і групі ампіциліну гинуть протягом двох днів. Виживають 85 % мишей у групі поліпептиду проти *S. aureus* і групі поліпептиду 1 проти *S. aureus*.

Експеримент 2: Через 14 днів після експерименту 1 нову партію мишей Kunming групують у контрольну групу й групу ампіциліну. Мишей, що вижили, із групи поліпептиду проти *S. aureus* і групи поліпептиду 1 проти *S. aureus* групують у групу поліпептиду проти *S. aureus* і групу поліпептиду 1 проти *S. aureus* для повторення описаного вище експерименту. Усі миші в контрольній групі і групі ампіциліну гинуть протягом двох днів. Виживають 75 % мишей у групі поліпептиду проти *S. aureus* і виживають 90 % мишей у групі поліпептиду 1 проти *S. aureus*.

Експеримент 3: Через 41 день після експерименту 1 нову партію мишей Kunming групують у контрольну групу, групу левофлоксацину і групу цефтриаксону натрію. Мишей, що вижили, із групи поліпептиду проти *S. aureus* і групи поліпептиду 1 проти *S. aureus* групують у групу поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* і групу поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*.

Мишам внутрішньочеревинно ін'єктують летальну дозу мультирезистентного *Pseudomonas aeruginosa* (клінічні ізоляти 13578, з кафедри експериментальної медицини Західнокитайського госпіталю Сичуанського університету). Через одну годину,

контрольній групі однократно ін'єктують 0,5 мл 0,3 моль/л WO 2011/072501 + 50 ммоль/л боратного буфера у хвостову вену;

групі левофлоксацину однократно ін'єктують 5 мг/кг левофлоксацину у хвостову вену;

групі цефтриаксону натрію однократно ін'єктують 30 мг/кг цефтриаксону натрію у хвостову вену;

групі поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* однократно ін'єктують 8 мг/кг поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* у хвостову вену;

групі поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa* однократно ін'єктують 8 мг/кг поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* у хвостову вену.

5 Усі миші в контрольній групі і групі левофлоксацину гинуть протягом дня. Виживають 25 % мишей у групі цефтриаксону натрію. Виживають 60 % мишей у групі поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa*. Виживають усі миші в групі поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, що антитіло організму-хазяїна меншою мірою заважає ефекту кіллінгу мутантного поліпептиду, ніж такому ефекту поліпептиду дикого типу.

10 Див. Фігуру 3.

На 1 тижні, 2 тижні і 7 тижні експерименту, сироватку крові мишей із групи поліпептиду проти *S. aureus*/групи поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* і групи поліпептиду 1 проти *S. aureus*/групи поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa* кількісно аналізують за допомогою непрямого способу ELISA для виявлення антитіл у крові. У лунки мікропланшета з ферментною міткою вносять коліцин Ia дикого типу і мутантний поліпептид коліцину Ia, 100 нг/лунка. Перші антитіла являють собою сироваткові антитіла від мишей, що вижили, із групи поліпептиду проти *S. aureus*/групи поліпептиду 2 проти *Pseudomonas aeruginosa* і групи поліпептиду 1 проти *S. aureus*/групи поліпептиду 1 проти *Pseudomonas aeruginosa*. Друге антитіло являє собою антимишаче мічене антитіло кози. Перше антитіло негативного контролю являє собою 5 % розчин молока в PBS. Результати титрування 1:50000 є наступними (див. Фігуру 4):

	A(група поліпептиду проти <i>S. aureus</i> /група поліпептиду 2 проти <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	(група поліпептиду 1 проти <i>S. aureus</i> /група поліпептиду 1 проти <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
1(1 тиждень)	0,914	0,254
2(2 тиждень)	1,623	0,598
3(7 тиждень)	2,911	1,41
4(контроль)	0,065	0,069

Показано, що ймовірність реакції гіперчутливості організму-хазяїна, індукованої мутантним поліпептидом коліцину Ia, одержаним згідно із дійсним винаходом, нижче ніж ймовірність реакції гіперчутливості організму-хазяїна, індукованої коліцином Ia дикого типу.

25 Приклад 4. Ефект кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду *in vitro* щодо лімфоми Беркідта, викликаній вірусом EBV.

EBV-позитивна лінія клітин і EBV-негативна лінія клітин являють собою стандартні лінії клітин з АТСС (Американської колекції типових культур), США.

30 Культивування клітин: 0,1 мл суспензії відновлених клітин Raji повільно додають в 3 мл рідкого середовища 1640 (плюс 10 % сироватки) у чашці для культивування (розведення 1:30), перемішують і культивують в інкубаторі при 37 °C з CO₂. EBV-позитивна лінія клітин являє собою АТСС CCL-86 (стандартні клітини лімфоми Беркідта, які використовують у лабораторіях усього світу, клітини Raji, виділені у 12-річного африканського хлопчика в 1963 році).

35 Клітини для тестування групують в 3 групи.

Група 1 є контрольною групою, якій додають розчин консерванту (10 ммоль/л РВ+0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера (pH 7,4)) без протипухлинного поліпептиду.

Групі 2 додають 200 мкг/мл нового протипухлинного поліпептиду 1 (плазмід рСНСЕВ11, розчин консерванту 10 ммоль/л РВ + 0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера, pH 7,4).

40 Групі 3 додають 200 мкг/мл нового протипухлинного поліпептиду 2 (плазмід рСНСЕВ22, розчин консерванту 10 ммоль/л РВ + 0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера, pH 7,4).

Після культивування протягом 24 годин у чашку для культивування додають описані вище обробляючі засоби. Через 72 години після додавання обробляючих засобів, у чашку для культивування додають 20 мкл 100 мкмоль/л пропідію йодиду (PI) і через 10 хвилин спостерігають за допомогою мікроскопа. Результати показують, що клітини контрольної групи добре ростуть, а більшість клітин у групі нового протипухлинного поліпептиду 1 забарвлені червоним за допомогою PI, показуючи, що протипухлинний поліпептид руйнує клітинну мембрану, що веде до загибелі пухлинних клітин. При порівнянні кількості загиблих клітин ефект нового протипухлинного поліпептиду 2 серед двох нових протипухлинних пептидів виявляється не настільки хорошим, див. Фігуру 5.

50 Приклад 5. Спостереження мультифлуоресцентного забарвлення ефекту кіллінгу нового протипухлинного поліпептиду *in vitro* щодо клітин лімфоми Беркідта, викликаній вірусом EBV, і інших пухлинних клітин.

Умови культивування клітин такі ж, як у Прикладі 2. Три лінії клітин використані в експерименті: лінія EB-вірус позитивних клітин: ATCC CCL-86 (клітини Raji, клітини лімфоми Беркїтта); ATCC CRL-2230, лінія клітин злоякісної лімфосаркоми від 46-річного хворого на СНІД чоловіка, які є позитивними до вірусу EB і вірусу саркоми Капоші; лінія EB-вірус позитивних клітин: ATCC CRL-1648(CA-46, клітини, виділені з асцитичної рідини пацієнта, хворого на американську лімфому Беркїтта).

Кожну лінію групують в 2 групи для тестування. Групі 1 додають розчин консерванту (10 ммоль/л РВ + 0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера, (pH 7,4)) без нового протипухлинного поліпептиду. Групі 2 додають 200 мкг/мл нового протипухлинного поліпептиду 1 (плазмїда рCHCEB11), розчин консерванту являє собою 10 ммоль/л РВ + 0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера, pH 7,4.

Після культивування протягом 24 годин у чашку для культивування додають обробляючі засоби для описаних вище груп. Через 72 години після додавання обробляючих засобів у чашку для культивування додають два типи флуоресцентних барвників, тобто 20 мкл 50 мкмоль/л FITC і 20 мкл 50 мкмоль/л Rodamin-123 і через 10 хвилин спостерігають за допомогою мікроскопа Olympus IX-71.

Результати показують, що лінія EBV-негативних пухлинних клітин добре росте після обробки новим протипухлинним поліпептидом 1, а більшість клітин кожної лінії EBV-позитивних пухлинних клітин проявляють зникнення мітохондрій і ядра, набухають і некротизуються, більшість із них гинуть. Очевидно, у порівнянні із забарвленням PI в експерименті Прикладу 4, результат експерименту із мультифлуоресцентним забарвленням більш явно показує потужний ефект кїллінгу нового протипухлинного поліпептиду 1 проти EB-вірус позитивних пухлинних клітин, див. Фїгуру 6.

EBV-негативні пухлинні клітини добре ростуть, що означає, що новий протипухлинний поліпептид не атакує клітини без поверхневого антигену вірусу EB на мембрані клітини. Це означає, що новий протипухлинний поліпептид дійсного винаходу має ідеальну націлюючу специфічність і безпечність.

Приклад 6. Ефект кїллінгу нового протипухлинного поліпептиду щодо солїдної пухлини, вирощеної в голих мишей з підсадженими клітинами лімфоми Беркїтта, викликанї вірусом EB.

SCID їмунодефіцитні миші придбані в Шанхайському центрі лабораторних тварин Китайської академії наук. Мишей годують у відповідності зі стандартними вимогами до харчування. Усю воду, соломку для підстилки і корм стерилїзують високою температурою або УФ-випромїнюванням. Мишей годують протягом одного тижня у відносно асептичних умовах і використовують в їнокуляційному експерименті, якщо немає аномалїй.

Клітинні суспензїї Raji (ATCC CCL-86) і 1648 (ATCC CRL-1648) в експоненціальній фазі відбирають у 50 мл центрифужні пробїрки, центрифугують при 4°C. Надосадову рідину потїм зливають. Клітини ресуспендують у рїдкому культуральному середовищі 1640 (плїос теляча сироватка) до $1,0 \times 10^6$ клітин/мл. Мишам підшкірно їн'єктують 0,1 мл клітинної суспензїї Raji у лїву пахвову ямку та 0,1 мл клітинної суспензїї 1648 (ATCC CRL-1648) у праву пахвову ямку.

Через 3-4 дня після їн'єкції пухлина росте до близько 2 x 2 мм. Мишей з пухлиною групують в:

(групу А) розчину консерванту (10 ммоль/л РВ+0,2 моль/л NaCl фосфатного буфера (pH 7,4)) без протипухлинного поліпептиду в якості контрольної групи;

(групу В) нового протипухлинного поліпептиду 1 (плазмїда рCHCEB11) 300 мкг/миша/день (розраховане як 25 г) безперервно протягом 20 днів.

Десяти мишам кожної групи двїчі в день підшкірно їн'єктують 0,5 мл безперервно протягом 20 днів. За поведїнкою мишей спостерігають і документують кожен день. Розмїр пухлини визначають і фотографують кожні два дні.

Результат (див. Фїгуру 7) показує, що рїст пухлини в групі В нового протипухлинного поліпептиду значно пригнїчується, причому пухлини у 7 мишей зникають, а пухлини в їнших 3 мишей явно менше, нїж у контрольній групі. Новий протипухлинний поліпептид ефективний для пригнїчення у мишей росту солїдної пухлини, викликанї EBV-позитивними клітинами лімфосаркоми. Але новий протипухлинний поліпептид неефективний для пригнїчення у мишей росту солїдної пухлини, викликанї EBV-негативними клітинами лімфосаркоми.

Приклад 7. Спостереження за патологїєю в in vivo експерименті по елїмінації пухлини.

Спостереження за гїстопатологїєю пухлин: мишей умертвляють наприкінці експерименту їз Прикладу 6. Пухлини видаляють, фїксують в 10 % формалїні. Парафінові зрїзи забарвлюють HE (гематоксилїном і еозином) і спостерігають за допомогою звичайної оптичної мікроскопїї.

Солїдні пухлини мишей контрольної групи, які спостерігають за допомогою мікроскопїї, активно проліферують; клітини EBV-позитивних солїдних пухлин, одержані від мишей групи

- нового протипухлинного поліпептиду, значно зморщуються. Більша частина клітинної маси в зрізі являє собою некротичні пухлинні клітини, і спостерігають більшу ступінь перитуморальної лімфоцитарної інфільтрації. Результат гістопатології показує, що в період 20-денної обробки новий протипухлинний поліпептид знищив практично всі пухлинні клітини в солідній пухлині (див. Фігуру 8, D).
- 5

<110> Протеїн Дизайн Лаб., ЛТД.

<120> Новий поліпептид проти пухлини, викликаной вірусом EB, і його застосування і спосіб одержання.

<130> PC09622/JJQ

<160> 32

<170> PatentIn версія 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 5'ЎЎ-3'ЎЎ, сконструйований для мутації G11A в гені коліцину

<400> 1

cgtattacaa atcccgagc agaatcgctg ggg 33

<210> 2

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 3'ЎЎ-5'ЎЎ, сконструйований для мутації G11A в гені коліцину

<400> 2

ccccagcat tctgctcgg gatttgaat acg 33

<210> 3

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 5'ЎЎ-3'ЎЎ, сконструйований для мутації H22G в гені коліцину

<400> 3

gattcagatg gcggtaaatt atgggtg 27

<210> 4

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> олігонуклеотидний праймер 3'ЎЎ-5'ЎЎ, сконструйований для мутації H22G в гені коліцину

<400> 4

gattcagatg gcaccaaatt atgggtg 27

<210> 5
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 5'ЎІ-3'ЎІ, сконструйований для мутації A26G в гені коліцину

 <400> 5
 gaaattatgg gtgttgatat ttat 24

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 3'ЎІ-5'ЎІ, сконструйований для мутації A26G в гені коліцину

 <400> 6
 gaaattatga ccgttgatat ttat 24

 <210> 7
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 5'ЎІ-3'ЎІ, сконструйований для мутації V31L в гені коліцину

 <400> 7
 gttgatattt atctcaaccc tccacgtgc 30

 <210> 8
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 3'ЎІ-5'ЎІ, сконструйований для мутації V31L в гені коліцину

 <400> 8
 gacacgtgga gggttgagat aaatatcaac 30

 <210> 9
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 5'ЎІ-3'ЎІ, сконструйований для мутації H40D в гені коліцину

 <400> 9
 cgtgtcgatg tctttgatgg taccgccct gcat 34

<210> 10
 <211> 34
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> олігонуклеотидний праймер 3'ЎІ-5'ЎІ, сконструйований для мутації H40D в гені коліцину

 <400> 10
 atgcaggcgg ggtaccatca aagacatcga cacg 34

 <210> 11
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена VHCDR1 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

 <400> 11
 gcgaataagt tctggggtat ttcttcggt atgcattggg tgcgtcagta aataaaatat 60
 aagacaggc 69

 <210> 12
 <211> 69
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена VHCDR1 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

 <400> 12
 gcctgtctta tattttattt actgacgcac ccaatgcata ccgaaggaaa taccscagaa 60
 ctatttcgc 69

 <210> 13
 <211> 72
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена VHFR2 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

 <400> 13
 ggtatgcatt ggggtcgtca ggcccccgag aaaggtctgg agtgggtggc ctaataaaaa 60
 tataagacag gc 72

 <210> 14
 <211> 73
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена VHFR2 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

<400> 14

gcctgtctta tattttattt aggcacccca ctccagacct ttctcgggg gcctgacgca 60

cccaatgcat acc

73

<210> 15

<211> 69

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена (Rev)VICDR3 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

<400> 15

aaaggtctgg agtgggtggc cacctacccc tactctctacg gtcagggtta aataaaatat 60

aagacaggc

69

<210> 16

<211> 66

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена (Rev)VLCDR3 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB11

<400> 16

gcctgtctta tattttattt aacctgacc gtaggagtag ggggtggcca cccactccag 60

accttt

66

<210> 17

<211> 69

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена VHCDR1 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

<400> 17

gcgaataagt tctggggtat ttccttcggt atgcattggg tgcgtcagta aataaaatat 60

aagacaggc

69

<210> 18

<211> 69

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена VHCDR1 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

```

<400> 18
gcctgtctta tttttattt actgacgcac ccaatgcata ccgaaggaaa taccccagaa 60
cttattcgc 69

<210> 19
<211> 72
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена VHFR2 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

<400> 19
ggtatgcatt ggggtcgtca ggcccccgag aaaggtctgg agtgggtggc ctaataaaaa 60
tataagacag gc 72

<210> 20
<211> 73
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена VHFR2 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

<400> 20
gcctgtctta tttttattt aggccaccca ctccagacct ttctcgggg gcctgacgca 60
cccaatgcat acc 73

<210> 21
<211> 69
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер 5'ЎІ-3'ЎІ для гена VLCDR3 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

<400> 21
aaaggtctgg agtgggtggc cggtcagggt tactcctacc cctacaccta aataaaatat 60
aagacaggc 69

<210> 22
<211> 69
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> праймер 3'ЎІ-5'ЎІ для гена VLCDR3 в рекомбінаційній плазміді рCHCEB22

<400> 22
gcctgtctta tttttattt aggtgtaggg gtaggagtaa ccctgaccgg ccaccactc 60

```


cagaccttt

69

<210> 23

<211> 1878

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Ген, що кодує мутантний поліпептид коліцину Ia

<400> 23

```

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc gcagcagaat cgctggggta tgattcagat   60
ggcgggtgaaa ttatgggtgt tgatattat ctcaaccctc cactgtgcga tgtctttgat   120
ggtaaccccg ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg   180
gttgatgati ccccaacccg aagtatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac   240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa   300
cgccctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt   360
gccggaacg catagccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag   420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca   480
gagagccgga tgtgtttgc tgatctgat tctctcgtat tatctcccc ggaggccagg   540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc   600
gctgatatgc ttgtgaata cgagcgaga aaaggatc ttggacaccg gttgtcagag   660
ctggaaaaaa atggcggggc agccctgcc gttctgatg cacaacaggc ccgtctgctc   720
gggcagcaga caggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg   780
acggaatcgc ttaacacgc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa   840
cagaaaaaca cgctgacgg caaacgata gtttccctg aaaaattccc ggggcgttca   900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcgt gatccgagat ttcccggtac gataaaaatc   960
acaaccacgc cagtcacga taaccgtgca aacctgaatt atctctgag cactccggt   1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccg ttgtgacaga ggatgtggaa   1080
gttgacaaga aaattataa tgctgaagt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg   1140
ctgatgccca gaaataaat cacctctgct gaattcggg taaattcggc gagaaataac   1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag   1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagcttcc ggcataatc agaagatagc ggaagagaaa   1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg   1380
aatcagttt cagaaaaata tgggcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg   1440

```

caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaagagtac 1500
 cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
 gagtctgtga agctgtciga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
 tatgcaggaa aattacaag tcttgctgac tggatcactg agtttgtaa ggcgtgccgg 1680
 acagagaact ggcgtcctct tttgttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
 acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
 tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
 aataagtctt ggggtatt 1878

<210> 24

<211> 625

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність мутантного поліпептиду коліцину Іа

<400> 24

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
 20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
 35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
 50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
 85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
 100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
 115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly

130	135	140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu		
145	150	155 160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg		
	165	170 175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala		
	180	185 190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg		
	195	200 205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
	210	215 220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
	225	230 235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
	245	250 255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
	260	265 270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		
	275	280 285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
	290	295 300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
	305	310 315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
	325	330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
	340	345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
	355	360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		

370	375	380	
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu			
385	390	395	400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala			
405	410	415	
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn			
420	425	430	
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr			
435	440	445	
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu			
450	455	460	
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln			
465	470	475	480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr			
485	490	495	
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg			
500	505	510	
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser			
515	520	525	
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe			
530	535	540	
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr			
545	550	555	560
Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly			
565	570	575	
Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly			
580	585	590	
Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly			
595	600	605	
Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly			

610

615

620

Ile

625

<210> 25

<211> 28

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність міметичного антитіла VHCDR1- VHFR2-VLCDR3

<400> 25

er Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu

1

5

10

15

Trp Val Ala Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

20

25

<210> 26

<211> 84

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує міметичне антитіло VHCDR1- VHFR2-VLCDR3

<400> 26

tccttcggta tgcattgggt gcgtcaggcc cccgagaaag gtctggagtg ggtggccggt 60

cagggttact cctaccacct cacc

84

<210> 27

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність міметичного антитіла VHCDR1- VHFR2-JERevJ©VLCDR3

<400> 27

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu

1

5

10

15

Trp Val Ala Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr Gly Gln Gly

20

25

<210> 28

<211> 84

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує міметичне антитіло VHCDR1- VHFR2- (Rev)VLCDR3

<400> 28

tccttcggtg tgcattgggt gcgtcaggcc cccgagaaag gtctggagtg ggtggccacc 60

taccctact cctacggtca gggt

84

<210> 29

<211> 653

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність 1 поліпептиду проти пухлини, викликаной вірусом EB

<400> 29

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly
130 135 140

Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu
145 150 155 160

Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg
165 170 175

Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala
 180 185 190
 Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly
 210 215 220
 Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu
 245 250 255
 Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg
 260 265 270
 Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr
 275 280 285
 Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser
 290 295 300
 Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr
 305 310 315 320
 Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser
 325 330 335
 His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro
 340 345 350
 Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu
 355 360 365
 Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn
 370 375 380
 Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
 405 410 415

Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
 420 425 430

Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
 435 440 445

Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
 450 455 460

Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
 465 470 475 480

Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
 485 490 495

Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
 500 505 510

Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
 515 520 525

Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
 530 535 540

Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr
 545 550 555 560

Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
 565 570 575

Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
 580 585 590

Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
 595 600 605

Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly
 610 615 620

Ile Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
 625 630 635 640

Glu Trp Val Ala Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
 645 650

<210> 30
 <211> 1962
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує амінокислотну послідовність 1 поліпептиду проти пухлини, викликаної вірусом EB

<400> 30

atgtctgacc ctgtacgtat tacaatccc gcagcagaat cgctgggta tgattcagat 60
 ggcgggtgaaa ttatgggtgt tgatattat ctcaaccctc cacgtgtcga tgttttcat 120
 gtacccccgc ctgcatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180
 gtgatgatt ccccaaccgc aagtgtatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac 240
 aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300
 cgcctctctg cggcgattgc tgcaaggaa aaagtgtgaa acacactgaa aacactccgt 360
 gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca gcacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
 ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
 gagagccgga tgcgtttgc tgatgctgat tctctcgtat tatctcccc ggaggccagg 540
 tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600
 gctgatatgc ttgtgaata cgagcgaga aaagggtatc tggacaccgc gtgtcagag 660
 ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gtcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720
 ggcgacgaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg 780
 acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
 cagaaaaaca cgcctgacgg caaacgata gttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900
 tcaaaaatc attctatgt tgtgagcgg gatccgagat ttgccgtac gataaaaatc 960
 acaaccagcg cagtcacga taaccgtgca aacgtgaat atctctgag ccattccggt 1020
 ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggaatggaa 1080
 ggtgacaaga aaatttataa tctgaaggt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
 ctgtatgcca gaaataaat cacctctgct gaatctcgg taaattcggc gagaataaac 1200
 ctgagtcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctctaatgc cctgttgaag 1260
 gaaaaagaga atatacgtaa ccagcttcc gccatcaat agaagatagc ggaagagaaa 1320
 agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta attcacaac agagttcctg 1380
 aatcagttt cagaaaaata tggcgaaaa gctgagcagt tagccagaga gatgccggg 1440
 caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaacgta tgaagaatgac 1500

cgggctgaca ttaacaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
 gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
 tatgcaggaa aattlacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
 acagagaact ggcgtcctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
 accgctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgcttagg cattatcggg 1800
 tatggtttac tgatggctgt caccgggtcg ctgattgatg aatcgctgt ggaaaaagcg 1860
 aataagttct ggggtatttc cttcggtatg cattgggtgc gtcaggcccc cgagaaaggt 1920
 ctggagtggg tggccgtgca gggttactcc taccctaca cc 1962

<210> 31

<211> 653

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Амінокислотна послідовність 2 нового поліпептиду проти пухлини, викликаной вірусом EB

<400> 31

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
 20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
 35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
 50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
 65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
 85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
 100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
 115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly

130	135	140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu		
145	150	155 160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg		
	165	170 175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala		
	180	185 190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg		
	195	200 205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly		
	210	215 220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly		
	225	230 235 240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu		
	245	250 255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg		
	260	265 270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr		
	275	280 285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser		
	290	295 300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr		
	305	310 315 320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser		
	325	330 335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro		
	340	345 350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu		
	355	360 365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn		

370 375 380
 Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
 405 410 415
 Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
 420 425 430
 Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
 435 440 445
 Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
 450 455 460
 Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
 465 470 475 480
 Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
 485 490 495
 Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
 500 505 510
 Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
 515 520 525
 Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
 530 535 540
 Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr
 545 550 555 560
 Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
 565 570 575
 Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
 580 585 590
 Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
 595 600 605
 Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly

610

615

620

Ile Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
625 630 635 640

Glu Trp Val Ala Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr Gly Gln Gly
645 650

<210> 32

<211> 1962

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Нуклеотидна послідовність, що кодує амінокислотну послідовність 2 нового поліпептиду проти пухлини, викликаної вірусом EB

<400> 32

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc gcagcagaat cgctggggta tgattcagat 60
ggcgggtgaaa ttatgggtgt tgatatattat ctcaaccctc cacgtgtcga tgtctttgat 120
ggtaccccg ctcgatggag ttcttcggg aacaaaacca tctggggcgg aacagagtg 180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgta 240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300
cgctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt 360
gccggaaacg cagatgccgc tgatatata cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
ctgagagaat acgattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
gagagccgga tctgtttgc tgatgctgat tctctcgtat tatctcccg ggaggccagg 540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc 600
gtgatatgc ttgctgaata cgagcgaga aaaggtattc tggacaccg gttgtcagag 660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttctgatg cacaacaggc ccgtctgctc 720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagtcagtg 780
acggaatgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gttccctg aaaaattccc ggggcgttca 900
tcaacaaatc attctattgt tctgagcggg gatccgagat tggccgtac gataaaaaatc 960
acaaccagcg cagtcacgca taaccgtgca aacctgaatt atctctgag ccattccggt 1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080
ggtgacaaga aaattataa tctgaagtt gctgaatggg ataagttac gcaaagattg 1140
cttgatcca gaataaaat cacctctgct gaattcggg taaatcggc gagaataaac 1200

```

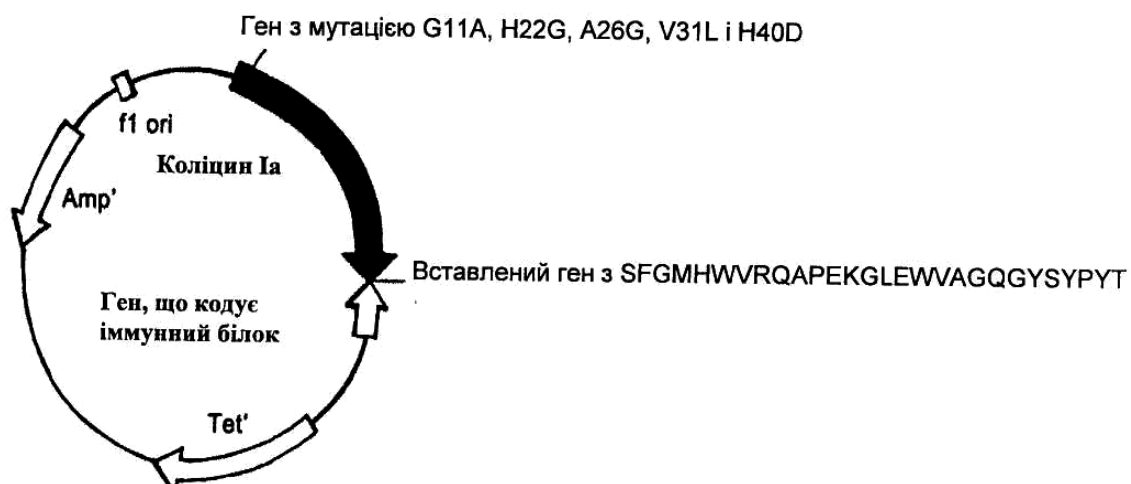
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctctaatgc cctgtgaag 1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
aatcagttt cagaaaaata tgggtcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
gagtcgttga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
tatgcaggaa aattacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
acagagaact ggcgtcctct tttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
acggctcttg tggcactggt ctcagtaft cttaccggaa gcgcttagg cattatcggg 1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtcg ctgattgatg aatcgcttgt gaaaaagcg 1860
aataagtctt ggggtatttc cttcggtatg cattgggtgc gtcaggcccc cgagaaaggt 1920
ctggagtggg tggccaccta cccctactcc tacggtcagg gt 1962

```

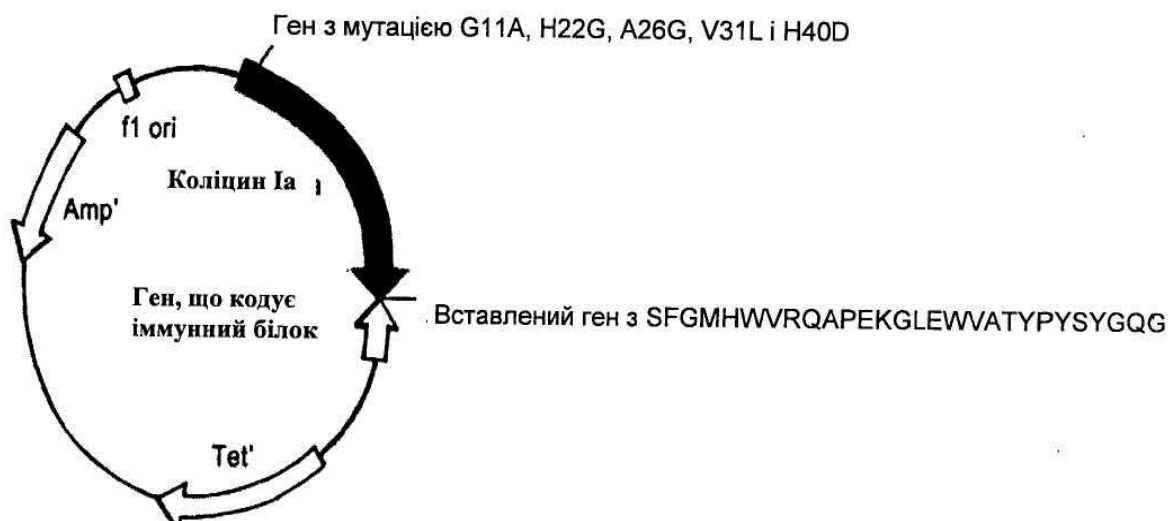
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Поліпептид проти пухлини, викликаній вірусом EB, який утворюють шляхом функціонального зв'язування мутантного поліпептиду коліцину, здатного утворювати іонні канали, з поліпептидом антитіла до вірусу EB або поліпептидом міметиків антитіл до вірусу EB, мутантний поліпептид коліцину, здатний утворювати іонні канали, одержують шляхом мутації амінокислотних залишків G11A, H22G, A26G, V31L і H40D у пептидному ланцюзі коліцину дикого типу Ia, амінокислотна
- 10 послідовність поліпептиду антитіла до вірусу EB є тією ж, що у поліпептиді моноклонального антитіла, секретованого гібридомою ATCC HB-168, де поліпептид проти пухлини, викликаній вірусом EB, має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID NO: 29.
- 15 2. Поліпептид проти пухлини, викликаній вірусом EB, за п. 1, де поліпептид міметиків антитіл являє собою з'єднаний пептид регіону CDR1 важкого ланцюга, зв'язувальний пептидний сегмент CDR1-CDR2 важкого ланцюга і CDR3 легкого ланцюга антитіла до вірусу EB.
3. Поліпептид проти пухлини, викликаній вірусом EB, за п. 2, де мутантний поліпептид коліцину, здатний утворювати іонні канали, одержують шляхом мутації коліцину Ia дикого типу.
4. Ген, що кодує поліпептид проти пухлини, викликаній вірусом EB, за кожним з пп. 1-3.
5. Ген за п. 4, який має нуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO: 30.
- 20 6. Рекombінаційна плазмiда, що містить ген за п. 4.
7. Спосіб отримання поліпептиду проти пухлини, викликаній вірусом EB, за кожним з пп. 1-3, що включає етапи, на яких трансформують рекombінаційну плазмiду за п. 6 в експресійну систему для експресії і виділяють експресований поліпептид.
8. Застосування поліпептиду проти пухлини, викликаній вірусом EB, за кожним з пп. 1-3 для
- 25 отримання ліків для лікування і профілактики пухлини, викликаній вірусом EB.
9. Мутантний поліпептид коліцину Ia, в якому його амінокислотна послідовність показана в SEQ ID NO: 24, при цьому мутантний поліпептид коліцину, здатний утворювати іонні канали, одержаний шляхом мутації амінокислотних залишків G11A, H22G, V31L і H40D у пептидному ланцюзі коліцину дикого типу Ia.
- 30 10. Ген, що кодує мутантний поліпептид коліцину Ia за п. 9.

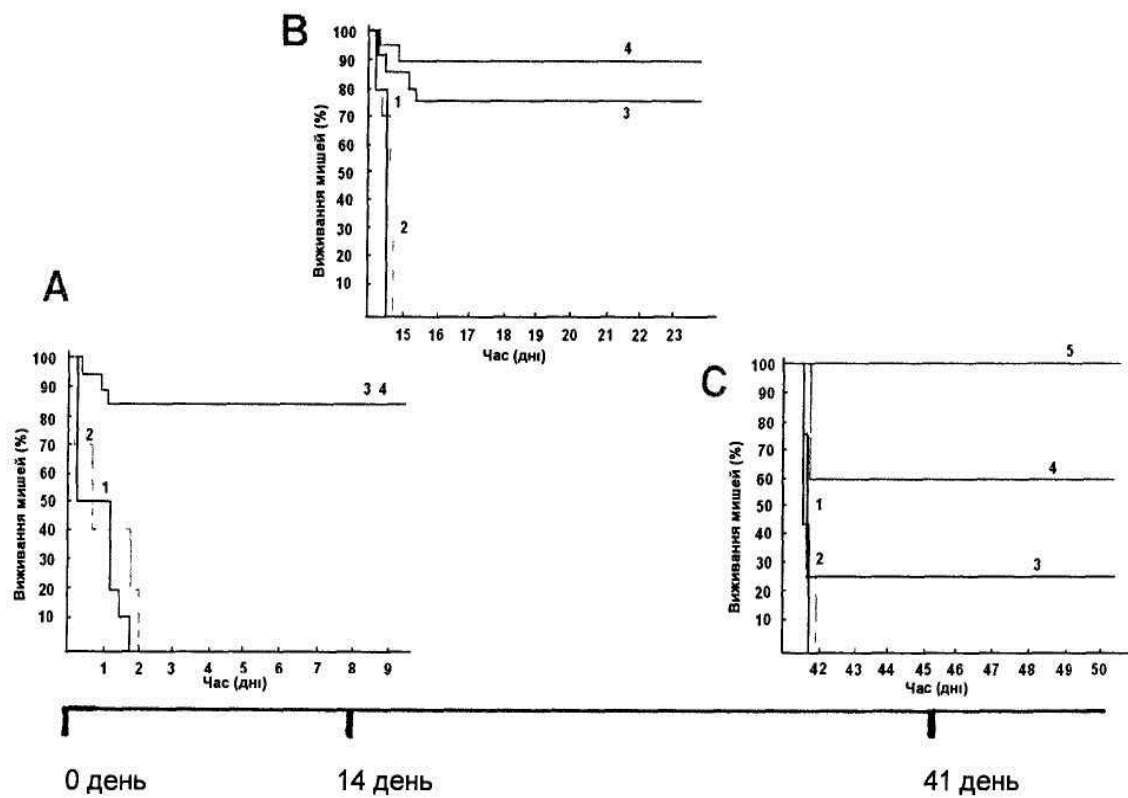
11. Застосування гена за п. 10 для отримання пептидних ліків, функціонального зв'язування зазначеного гена з геном, що індукує пептид, клонування в експресійний вектор, потім трансформування експресійного вектора в експресійну систему і виділення експресованого поліпептиду.



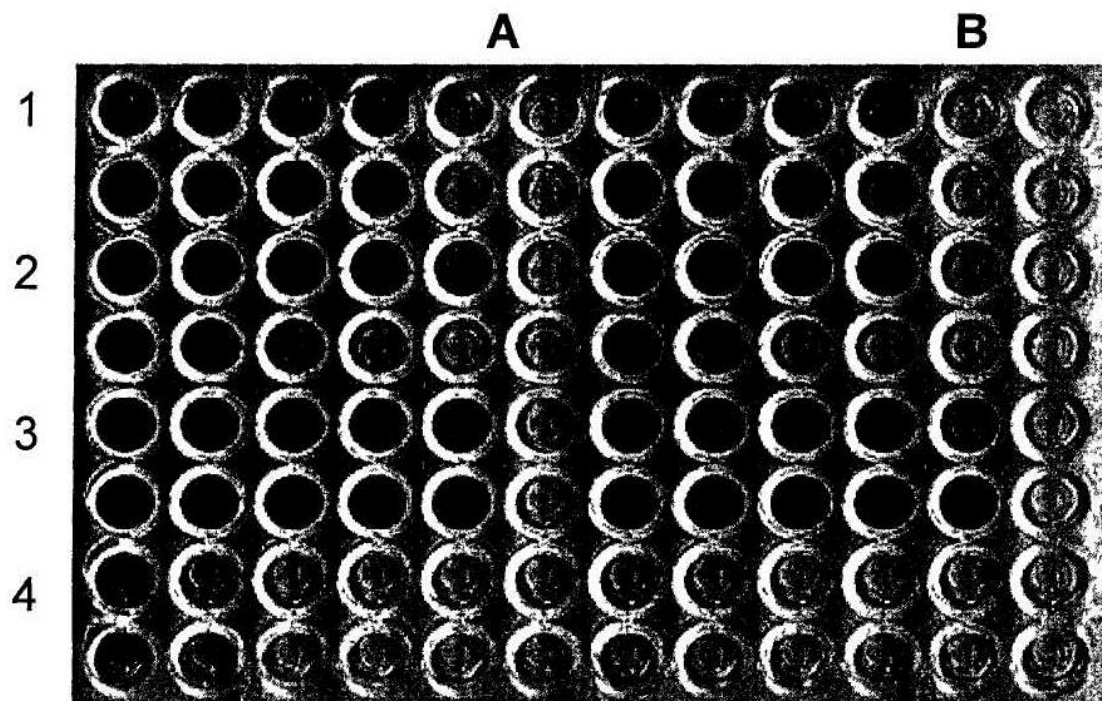
Фігура 1



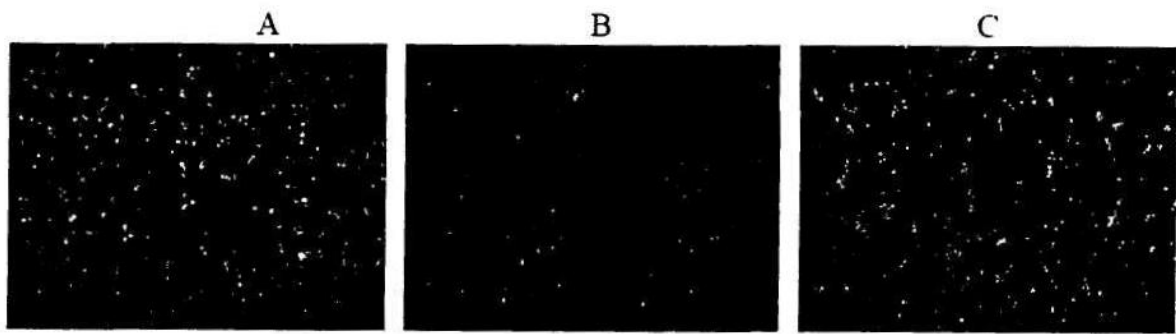
Фігура 2



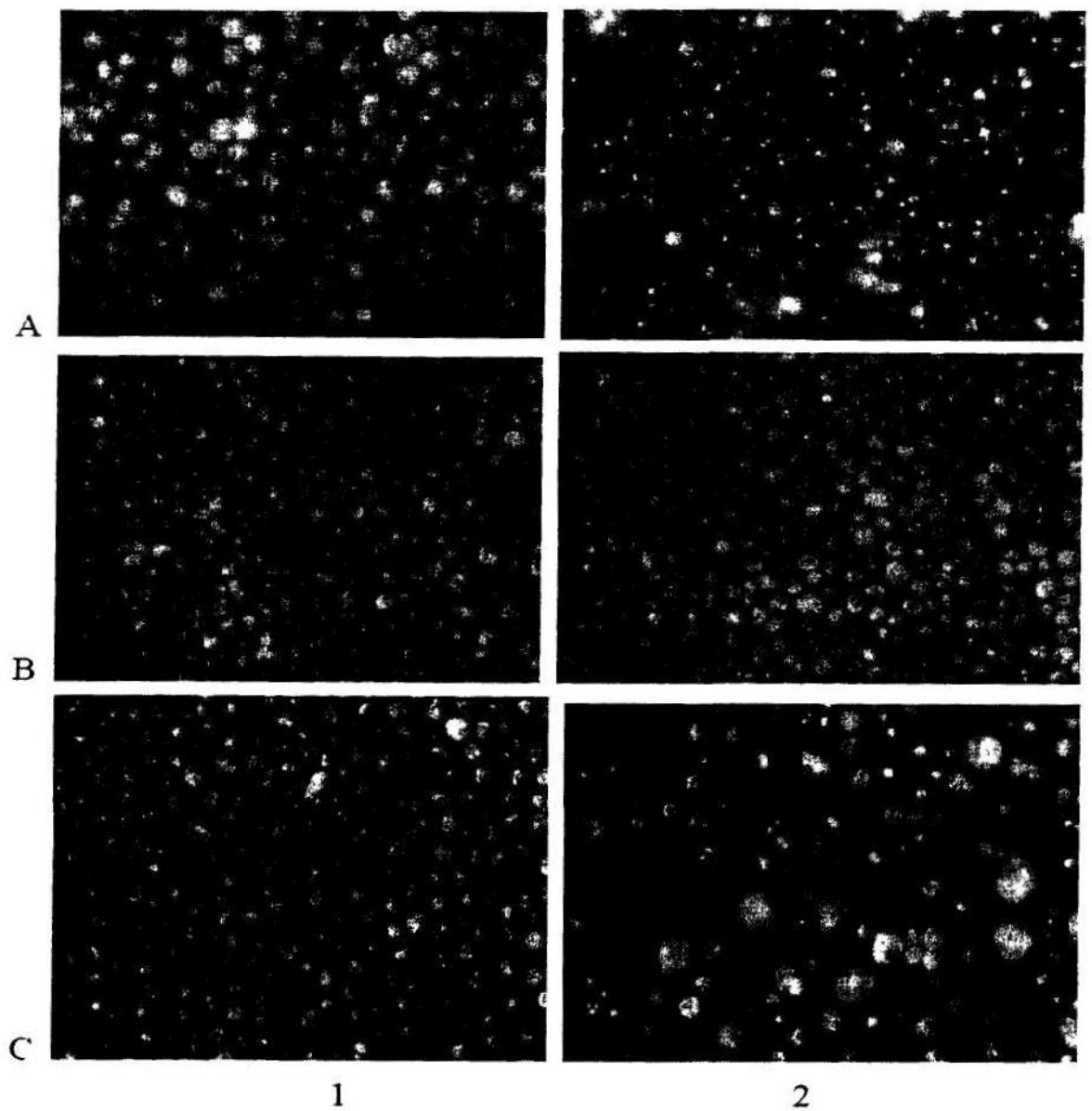
Фігура 3



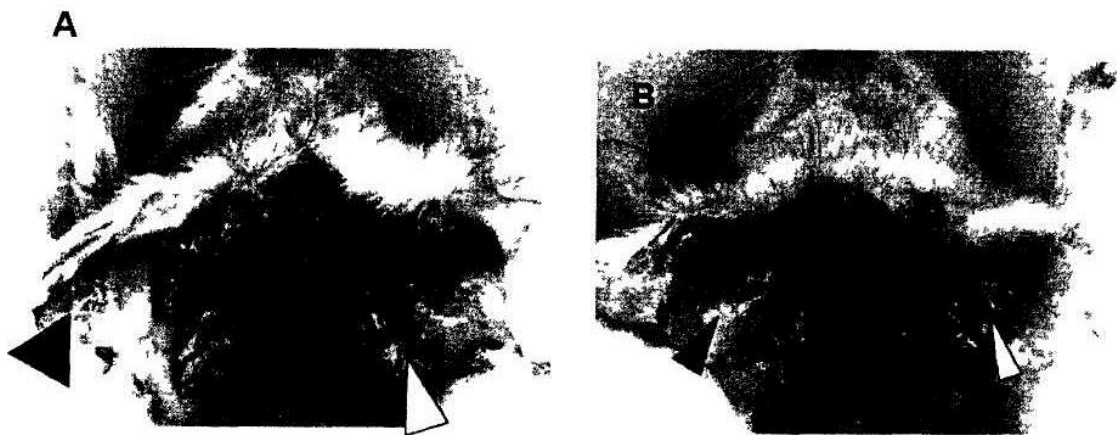
Фігура 4



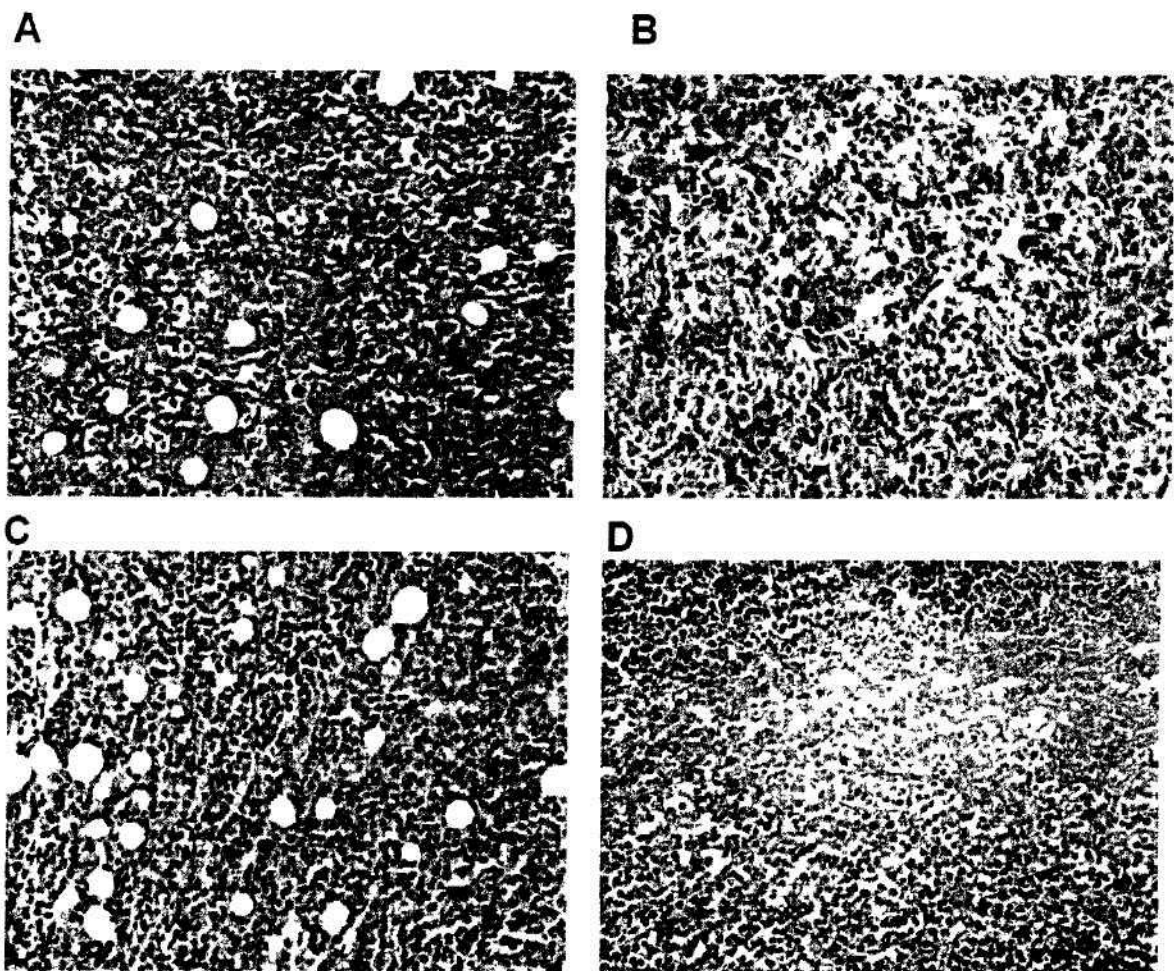
Φίγυρα 5



Φίγυρα 6



Фігура 7



Фігура 8

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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