

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038959**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.15

(21) Номер заявки
201391187

(22) Дата подачи заявки
2012.02.10

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ И НАБОР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПУТЕМ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ НК-КЛЕТОК

(31) 10-2011-0012983

(32) 2011.02.14

(33) KR

(43) 2013.12.30

(86) PCT/IB2012/000259

(87) WO 2012/110878 2012.08.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НКМАКС КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ли Джэ Мюн, Ён Чоо Чхуун, Парк Сан Воо, Ким Чон Сун (KR)

(74) Представитель:
Лыу Т.Н., Угрюмов В.М. (RU)

(56) KIMBERLY L. KANE et al. Determination of Natural Killer Cell Function by Flow Cytometry. CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY. 1996, Vol. 3, No. 3, pp. 295-300. See the whole document, especially, abstract, pp. 295, 296

M. FIROZ MIAN et al. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. Journal of Leukocyte Biology. 2008, Vol. 83, No. 3, pp. 774-784. See the whole document, especially, abstract, pp. 774, 775
KR-B1-100565764

K. TAKEDA 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, pp. 109-115. See the whole document, especially, pp. 109, 114

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. 1994. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. See the whole document
KR-A-1019890009978

(57) Изобретение относится к способу диагностики злокачественной опухоли, набору и композициям для диагностики, пригодным для измерения активности НК-клеток. Вероятность возникновения злокачественной опухоли может быть диагностирована посредством отслеживания изменений иммунной системы *in vivo* при помощи измерения активности НК-клеток в крови. Таким образом, вероятность возникновения злокачественной опухоли может быть легко спрогнозирована, как описано в настоящей заявке, с применением образца крови от субъекта.

B1

038959

038959

B1

Ссылка на родственную заявку

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

Область техники

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

Уровень техники

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

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

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

Сущность изобретения

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

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

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

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

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

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

Кроме того, в соответствии с определенными вариантами осуществления способ может быть выполнен с применением по меньшей мере одного стимулирующего цитокина, слитого со стабилизирую-

щим пептидом. Например, и без ограничения, стабилизирующий пептид может представлять собой пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. В соответствии с такими вариантами осуществления стабилизирующие пептиды могут содержать аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO: 23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO: 24) или аминокислотные остатки ISO-140 (SEQ ID NO: 25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO: 27), аминокислотные остатки 1-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 28) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 29).

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

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

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

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

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

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

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

В соответствии с определенными неограничивающими вариантами осуществления описанного химерного белка пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов может содержать аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO: 23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO: 24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO: 27), аминокислотные остатки 1-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 28) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 29).

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

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

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

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

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

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

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

Краткое описание чертежей

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

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

фиг. 2 - фотоснимок, демонстрирующий результаты электрофореза очищенных химерных белков SP,

фиг. 3 - активность искусственно активированных у здорового человека НК-клеток по результатам анализа количества выработанного интерферона- γ при стимулировании НК-клеток отдельным цитокином (фиг. 3A) или комбинированными цитокинами (фиг. 3B-3D),

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

фиг. 5 - сравнение белковой активности (A) и стабильности (B) между SP IL-2 и IL-2,

фиг. 6 - активность НК-клеток у здоровых людей и больных злокачественным заболеванием, которых обработали отдельно SP IL-2 (10 нг/мл) (условие A) и SP IL-2 (5 нг/мл) + IL-12 (5 нг/мл) (условие B),

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

фиг. 8 - диаграмму, демонстрирующую разницу в количестве секретированного из НК-клеток у здорового человека интерферона- γ при стимуляции ЛПС,

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

фиг. 10 - диаграмму, демонстрирующую различие в количестве секретированного интерферона- γ в зависимости от стадии прогрессирования злокачественной опухоли,

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

фиг. 12 - результаты проточной цитометрии цельной крови от здоровых людей при стимуляции цитокинами.

Подробное описание изобретения

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

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

Было обнаружено, что исходя из наблюдений, что активность НК-клеток является сниженной у больных злокачественным заболеванием, вероятность возникновения злокачественной опухоли можно преимущественно отслеживать путем измерения активности НК-клеток. С помощью описываемого в настоящем документе способа можно определить нормально функционируют НК-клетки или нет, как правило, подавая искусственный стимул НК-клеткам, и измерить уровень активации НК-клеток путем определения изменений количества присутствующих в образце крови секретированных НК-клетками цитокинов, что отличается от других способов, которые предусматривают просто измерение изначально присутствующих в образце крови числа НК-клеток или количества цитокинов. Например, в традиционном способе измерения уровня активации НК-клеток анализ по высвобождению ^{51}Cr применяли в качестве способа измерения направленной на мишень цитотоксичности. Однако при измерении активности НК-клеток таким способом необходимо было применять радиоактивный изотоп, а измерение и анализ являются затруднительными, сложными и дорогостоящими. Поэтому анализ не подходит для применения при скрининг-анализе/способах тестирования первичной злокачественной опухоли, с помощью ко-

торых можно просто диагностировать вероятность возникновения злокачественной опухоли. С другой стороны, в соответствии с настоящим изобретением поскольку активность НК-клеток может быть измерена путем стимулирования НК-клеток к выработке секретируемых НК-клетками цитокинов и количественного определения выработанных секретируемых НК-клетками цитокинов, субъект, у которого снижена активность НК-клеток, может быть преимущественно отобран как страдающий злокачественной опухолью или подверженный риску заболевания злокачественной опухолью субъект.

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

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

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

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

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

В соответствии с настоящим изобретением цифровую величину секретируемых НК-клетками цитокинов применяют в качестве критерия для оценки активности НК-клеток. В соответствии с настоящим изобретением фраза "секретируемые НК-клетками цитокины" относится к цитокинам, которые секретируются НК-клетками, в частности цитокинам из активированных при помощи искусственной стимуляции НК-клеток. В соответствии с одним вариантом осуществления секретируемые НК-клетками цитокины являются по меньшей мере одним цитокином, выбранным из группы из интерферона-гамма (IFN- γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) и макрофагального белка воспаления 1 β (MIP-1 β). Интерферон- γ секретируется НК-клетками, дендритными клетками, цитотоксическими Т-клетками, Th1-клетками и т.п. и известен в качестве цитокина, который играет важную роль во врожденном иммунитете и приобретенном иммунитете для борьбы с злокачественной опухолью. Также фактор некроза опухоли альфа (TNF- α)

уничтожает злокачественные клетки и дополнительно принимает участие в киллинге инородного объекта, такого как бактерия, индуцируя активацию Т-клеток и играя роль добавочного фактора для продуцирования антитела В-клетками. Поэтому, например, если цифровая величина интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа меньше, чем цифровая величина интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа у здорового человека, то это указывает на то, что существует проблема с активностью НК-клеток для борьбы с злокачественной опухолью. Следовательно, можно определить активность НК-клеток путем сравнения количества секретированного искусственно активированными НК-клетками интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа с количеством интерферона- γ или фактора некроза опухоли альфа у здорового человека.

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

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

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

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

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

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

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

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

сывороточный альбумин или человеческий сывороточный альбумин, но не ограничивается ими.

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

Активность НК-клеток может быть измерена путем сравнения количества секретируемых НК-клетками цитокинов, которые секретируются искусственно активированными НК-клетками, с количеством секретируемых НК-клетками цитокинов у здорового человека. В этом случае, если количество секретируемых НК-клетками цитокинов меньше, чем количество секретируемых НК-клетками цитокинов у здорового человека, то активность НК-клеток считают сниженной. Следовательно, можно оценить риск заболевания злокачественной опухолью или рецидива злокачественной опухоли. Если активность НК-клеток снижена по сравнению со здоровым человеком, субъект может быть первично классифицирован как страдающий злокачественной опухолью пациент или больной рецидивирующей злокачественной опухолью. Также вероятность заболевания или рецидив злокачественной опухоли могут быть диагностированы посредством дополнительного диагностического способа, такого как КТ, МРТ или позитрон-эмиссионная томография (ПЭТ) для обычно осуществляемой диагностики злокачественной опухоли, и посредством завершающего анализа ткани. Хотя способ в соответствии с настоящим изобретением не является способом окончательной диагностики злокачественной опухоли, способ имеет хорошее преимущество в том, что может быть осуществлен первичный скрининг-анализ на вероятность возникновения или рецидив злокачественной опухоли с помощью образца крови.

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

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

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

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

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

Применяемый для иммунологического анализа реактив включает подходящий носитель, способную генерировать определяемый сигнал метку, растворитель и детергент. Также если материалом метки является фермент, то реактив может включать субстрат, с помощью которого можно измерить ферментативную активность, и средство для остановки реакции. Подходящий носитель может включать без ограничения растворимый носитель, например один из известных в данной области физиологически доступных буферов (например, PBS), или нерастворимый носитель, например полимер, такой как магнитные частицы, образованные путем нанесения металла на полистирол, полиэтилен, полипропилен, полиэфир, полиакрилонитрил, фторсодержащую смолу, сшиваемый декстран, полисахарид и латекс и другие виды бумаги, стекла, металлов, агарозы и их комбинаций.

В качестве метки, которая может генерировать определяемый сигнал, может быть использован фермент, флуоресцирующий материал, люминесцирующий материал и радиоактивный материал. В каче-

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

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

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

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

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

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

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

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению химерного белка для активации НК-клеток. Как описано выше, такой химерный белок может быть использован для активации НК-клеток в крови с тем, чтобы способствовать секреции секретлируемых НК-клетками цитокинов.

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

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

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

Более того, настоящее изобретение относится к набору для диагностики злокачественной опухоли, который включает по меньшей мере один химерный белок, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, связанного с пептидом с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 12, связанного с пептидом с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, интерлейкина 15, связанного с пептидом с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, и интерлейкина 18, связанного с пептидом с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов. Как описано выше, при инкубации взятого от субъекта образца крови с химерным белком в образце крови активируются НК-клетки. Следовательно, активность НК-клеток у субъекта может быть измерена количественным определением выработанного в результате активации НК-клеток интерферона- γ , таким образом первично диагностируя злокачественную опухоль путем классификации

субъектов, которые имеют более низкую активность НК-клеток, чем активность у здорового человека, как подверженных риску заболевания злокачественной опухолью или имеющих рецидив злокачественной опухоли пациентов.

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

Помимо химерного белка такой набор для диагностики злокачественной опухоли может включать дополнительные компоненты, применяемые для осуществления способа диагностики в соответствии с настоящим изобретением, например антитело для количественного определения секретируемых НК-клетками цитокинов и подложку. Эти компоненты описаны выше в связи с набором для измерения активности НК-клеток. Также в набор могут быть включены инструкции для применения этих компонентов в описанном выше способе.

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

Примеры

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

Для получения IL-2, IL-12 IL-15 или IL-18, слитого со стабилизирующим пептидом, строили вектор экспрессии. Содержащий аминокислотные остатки 119-140 α -синуклеина (SEQ ID NO: 24; называемый далее "SP") пептид использовали в качестве стабилизирующего пептида. КДНК IL2, IL2p35, IL2p40, IL15 и IL-18 получали путем выделения общей РНК из лимфоцитов человека с помощью набора для выделения РНК (Invitron Biotechnology) и обратной транскрипции общей РНК при помощи обратной транскриптазы (Invitrogen). Полученную в результате кДНК использовали в качестве матрицы и амплифицировали при помощи ПЦП с применением следующих специфических к каждому гену к ДНК праймеров:

IL2-22-BamH1-F : ACAGGATCCCCTACTTCAAGTTCT (SEQ ID NO:11)
 IL2-153-Xho-R : CACTCTCGAGTCAAGTCAGTGTGAGAT (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 : ATGGTGATGATGGGAAGCATTCAGATAGC (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 : AGACTGGAATTCCTAGTCTTCGTTTTG (SEQ ID NO:20).

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

Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности химерного про-

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

Пример получения 2. Экспрессия и очистка рекомбинантного химерного белка SP.

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

Построенные для экспрессии рекомбинантного белка SP-hIL12 два вектора экспрессии трансфицировали в линии клеток насекомого, клетки sf21, с получением раствора вирусной культуры соответственно. Два полученных в результате раствора вирусной культуры одновременно трансфицировали в линии клеток насекомых sf21 с получением гетеродимерного белка IL2p70, у которого IL12p40 связан к IL2p35, и который затем очищали.

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

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

Очищенный химерный белок SP (3 мкг) подвергали электрофорезу в 15% ДСН-ПААГ для верификации конечного очищенного белка (фиг. 2 (а) белок SP-hIL2 (ATGen, кат. № ATGK04), (б) белок IL15-SP (ATGen, кат. № ATGK06) и (с) белок SP-IL18 (ATGen, кат. № ATGK07)).

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

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

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

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

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

Экспериментальный пример 2. Верификация разновидностей цитокинов, секретируемых искусственно активированными при помощи IL-2 НК-клетками.

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

В случае применяемых для теста на заболевание реактивов для диагностики *in vitro* использовали ряд валидационных методик. В целом, в соответствии с настоящим изобретением использовали нормальный диапазон и анализ порогового значения. Нормальный диапазон представляет собой эталонный диапазон, который использовали для измерения среднего значения и среднеквадратичного отклонения у каждой группы образцов, а анализ порогового значения представляет собой способ измерения клинической чувствительности и специфичности путем вычисления расчетной величины диагностического реактива *in vitro*. Клиническая чувствительность означает вероятность, признаваемую как демонстрирующую положительные результаты диагностического теста в случае, когда пациент страдает заболеванием, а клиническая специфичность означает вероятность, признаваемую как демонстрирующую отрицательные результаты диагностического теста в случае, когда пациент не страдает заболеванием.

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

Таблица 1

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

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

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

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

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

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

В результате было видно, что приблизительно 90% здоровых людей имели высокий уровень интерферона- γ , но большинство больных злокачественным заболеванием имели низкий уровень интерферона- γ в случае условия А, как показано на фиг. 6. В случае условия В также было видно, что здоровые люди имели высокий уровень интерферона- γ , а большинство больных злокачественным заболеванием имели

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

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

Для определения различия способности секретировать интерферон- γ при воздействии IL2 в зависимости от типа образцов крови от здоровых людей осуществляли следующий эксперимент. Измеряли (а) способность секретировать интерферон- γ у NK-клеток на 1 нг/мл IL2 от Т-клеток, (б) способность секретировать интерферон- γ у NK-клеток на 1 нг/мл IL2 от NK-клеток, (с) способность секретировать интерферон- γ у NK-клеток на 1 нг/мл IL2 из цельной крови и (д) способность секретировать интерферон- γ у NK-клеток в зависимости от концентрации IL2 от МКПК. Результаты показаны на фиг. 7. Интерферон- γ измеряли таким же способом, как описано выше. В результате, поскольку изменилось количество интерферона- γ , секретируемого в результате активации IL2 Т-клеток, но оно не сильно отличалось от количества интерферона- γ у не обработанной группы, то Т-клетки не были пригодны для применения в виде образца крови. У цельной крови, МКПК и NK-клетках есть значимое различие в количестве интерферона- γ по сравнению с количеством интерферона- γ у не обработанной группы. Поэтому цельную кровь, МКПК и NK-клетки оценивали как пригодные образцы крови для применения в способе и наборе в соответствии с настоящим изобретением.

Экспериментальный пример 6. Сравнение активности NK-клеток от здоровых людей при воздействии ЛПС.

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

Экспериментальный пример 7. Стимуляция NK-клеток при помощи hIL12 и hIL15, слитых со стабилизирующим пептидом.

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

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

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

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

В результате, были подтверждены способности секретировать интерферон- γ , по порядку, у здорового человека, больной злокачественной опухолью пациентки 1 и больного злокачественной опухолью па-

циента 2, как показано на фиг. 10. Таким образом, было подтверждено, что количества секретированного интерферона- γ в зависимости от стадии прогрессирования злокачественной опухоли отличались. На основании этих фактов было видно, что способ в соответствии с настоящим изобретением может быть использован для измерения количества секретируемого НК-клетками интерферона- γ в образце крови, таким образом прогнозируя вероятность возникновения и стадию прогрессирования злокачественной опухоли или прогнозируя рецидив злокачественной опухоли.

Экспериментальный пример 9. Количественное определение интерферона- γ , выработанного в результате стимуляции НК-клеток.

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

Инкубированную при 37°C цельную кровь от восьми здоровых людей центрифугировали при 1500-2000 g с получением сыворотки в виде супернатанта. Затем забирали 150-200 мкл сыворотки и провели ИФА на интерферон- γ . Первичное антитело с 0,05% Твина (моноклональное антитело к интерферону- γ человека, ATGen, кат. № ATGK02) развели буфером для сенсibilизации поверхностей (0,1 карбонат натрия, pH 9,5) в соотношении 1:1000. Разбавленное первичное антитело разделяли на 96-луночном титровальном микропланшете для ИФА (Nunc Maxisorp; NUNC, Нэпервилл, Иллинойс) с дозой по 100 мкл/луночка и оставили при температуре 4°C на 16-18 ч. После этого раствор удалили из планшета и промыли планшет промывающим раствором (содержащим 0,05% Твина 20 PBS) с дозой по 400 мкл/луночка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Затем PBS, содержащий 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), разделяли с дозой по 300 мкл/луночка и выдержали при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого раствор удалили из планшета и планшет промыли PBST (содержащим 0,05% Твина 20 раствором PBS) с дозой по 400 мкл/луночка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Покрытый первичным антителом 96-луночный титровальный микропланшет для ИФА герметично закрыли и хранили при 4°C до применения.

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

Таблица 2

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

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

Спустя 2 ч раствор из 96-луночного титровального микропланшета для ИФА удалили и промыли планшет промывающим раствором с дозой по 400 мкл/луночка. В этом случае промывание осуществляли три раза. Затем вторичное антитело (биотинилированное моноклональное антитело к интерферону- γ человека (ATGen кат. № ATGK03)) развели раствором для разведения в соотношении 1:500, разделяли с дозой по 100 мкл/луночка и затем выдержали при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого раствор удалили из планшета и планшет промыли три раза промывающим раствором с дозой по 400 мкл/луночка. Раствор конъюгированного с HRP стрептавидина (Thermo Scientific, кат. № 21130) развели раствором для разведения в соотношении 1:3000, разделяли с дозой по 100 мкл/луночка и затем выдержали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем разведенный раствор конъюгированного с HRP стрептавидина разделяли в планшете для ИФА и инкубировали в течение 1 ч. После одночасового инкубирования раствор из 96-луночного титровального микропланшета для ИФА удалили и планшет промыли три раза промывающим раствором с дозой по 400 мкл/луночка.

Для приготовления раствора субстрата 1 мг тетраметилбензидина (ТМБ) растворили в 1 мл диме-

тилсульфоксида (ДМСО) и полученную в результате смесь развели 9 мл 0,05М фосфат-цитратного буфера. Затем раствор субстрата разделяли по планшету с дозой по 100 мкл/лунка и выдержали при комнатной температуре в течение 30 мин.

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

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

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

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ измерения активности натуральных клеток-киллеров (НК), включающий стимулировать НК-клеток в образце цельной крови посредством инкубирования образца цельной крови со средством, содержащим по меньшей мере один стимулирующий цитокин, выбранный из группы, состоящей из интерлейкина 2, интерлейкина 15 и интерлейкина 18, и таким образом искусственно активируя НК-клетки к выработке и секреции секретлируемых НК-клетками цитокинов; и измерение количества секретлируемых НК-клетками цитокинов, секретированных в образце цельной крови, и используя количество в качестве критерия для оценки активности, при этом секретлируемые НК-клетками цитокины содержат интерферон-гамма (IFN- γ), или фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), или и то, и другое.
2. Способ по п.1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 2.
3. Способ по п.1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 2 и интерлейкином 12.
4. Способ по п.1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 15 и интерлейкином 12.
5. Способ по п.1, где стимуляцию НК-клеток осуществляют посредством инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 15.
6. Способ по любому из пп.1-5, где секретлируемые НК-клетками цитокины дополнительно содержат макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β).
7. Способ по любому из пп.1-5, где секретлируемым НК-клетками цитокином является интерферон-гамма (IFN- γ).
8. Способ по любому из пп.1-5, где секретлируемым НК-клетками цитокином является фактор некроза опухоли альфа (TNF- α).
9. Способ по п.6, где макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β) применяют в качестве контрольной группы для сравнения активации НК-клеток с активацией у здорового человека.
10. Способ по любому из пп.1-9, где измерение количества секретлируемых НК-клетками цитокинов осуществляют посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и других иммунологических анализов.
11. Способ по любому из пп.1-10, где по меньшей мере один стимулирующий цитокин находится в

форме химерного белка со стабилизирующим пептидом, при этом стабилизирующий пептид представляет собой пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, при этом стабилизирующий пептид содержит аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокислотные остатки 114-126 (SEQ ID NO: 23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO: 24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO: 27), аминокислотные остатки 1-127 γ -синуклеина (SEQ ID NO: 28) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 29).

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором стадию стимуляции NK-клеток в образце цельной крови и, таким образом, искусственной активации NK-клеток к выработке и секреции секретируемых NK-клетками цитокинов осуществляют в среде, содержащей белок-носитель.

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

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором указанный способ применяется для определения вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли, где понижение количества секретируемых NK-клетками цитокинов у субъекта по сравнению с уровнями у здоровых людей является показателем вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

15. Способ по любому из пп.1-14, в котором измерение активности NK-клеток включает сравнение измеренного количества секретируемых NK-клетками цитокинов, секретируемых в образце целой крови, с количеством, определенным у здорового индивидуума.

16. Способ по любому из пп.1-15, который выполняют посредством отслеживания изменений активности NK-клеток.

17. Способ по п.1, в котором стимулирование NK-клеток осуществляется путем инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 2 или интерлейкином 2, слитым со стабилизирующим пептидом.

18. Способ по п.1, в котором стимулирование NK-клеток осуществляется путем инкубирования образца цельной крови с интерлейкином 15 или интерлейкином 15, слитым со стабилизирующим пептидом.

19. Способ по любому из пп.13, 17 или 18, в котором секретируемый NK-клетками цитокин представляет собой интерферон-гамма (IFN- γ).

20. Способ по любому из пп.1-19, в котором образец цельной крови представляет собой образец цельной крови человека.

21. Набор для измерения активности натуральных клеток-киллеров (NK), содержащий средство для стимуляции NK-клеток в образце цельной крови посредством инкубирования образца цельной крови, таким образом, искусственно активируя NK-клетки к выработке и секреции секретируемых NK-клетками цитокинов,

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

22. Набор по п.21, в котором секретируемые NK-клетками цитокины выбираются из группы, содержащей интерферон-гамма (IFN- γ), фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) или оба.

23. Набор по п.22, в котором секретируемые NK-клетками цитокины дополнительно содержат макрофагальный белок воспаления 1 β (MIP-1 β).

24. Набор по любому из пп.21-23, в котором секретируемым NK-клетками цитокином является интерферон-гамма (IFN- γ).

25. Набор по любому из пп.21-23, в котором секретируемым NK-клетками цитокином является фактор некроза опухоли альфа (TNF- α).

26. Набор по любому из пп.21-23, дополнительно содержащий по меньшей мере одно антитело, выбранное из группы, содержащей антитело к IFN- γ и антитело к TNF- α .

27. Набор по п.26, дополнительно включающий антитело к MIP-1 β .

28. Набор по любому из пп.21-27, дополнительно содержащий инструкции для сравнения количества секретируемых NK-клетками цитокинов у субъекта с уровнями у здоровых людей.

29. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 2.

30. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 2 и интерлейкин 12.

31. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 15 и интерлейкин 12.

32. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 15.

33. Набор по любому из пп.21-32, в котором по меньшей мере один стимулирующий цитокин находится в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом, при этом стабилизирующий пептид представляет собой пептид с С-концевым кислым хвостовым доменом из семейства синуклеинов, при этом стабилизирующий пептид содержит аминокислотные остатки 103-115 (SEQ ID NO: 22), аминокис-

лотные остатки 114-126 (SEQ ID NO: 23), аминокислотные остатки 119-140 (SEQ ID NO: 24) или аминокислотные остатки 130-140 (SEQ ID NO: 25) С-концевого кислого хвостового домена α -синуклеина, аминокислотные остатки 85-134 С-концевого кислого хвостового домена β -синуклеина (SEQ ID NO: 27), аминокислотные остатки 1-127 γ -синуклеина (SEQ ID NO: 28) или аминокислотные остатки 96-127 С-концевого кислого хвостового домена γ -синуклеина (SEQ ID NO: 29).

34. Набор по любому из пп.21-28, в котором по меньшей мере один стимулирующий цитокин находится в форме химерного белка со стабилизирующим пептидом, где химерный белок включает аминокислотную последовательность по меньшей мере с 80% идентичностью, или по меньшей мере 90% идентичностью, или по меньшей мере 95% идентичностью или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 8 или 10.

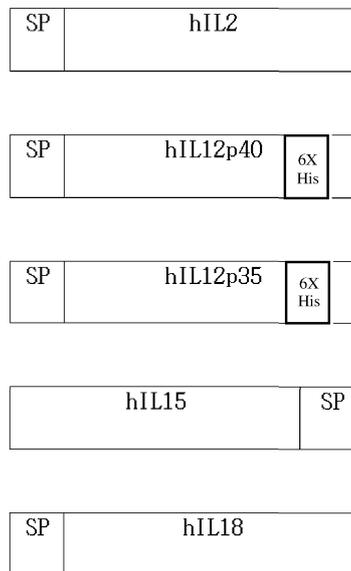
35. Набор по любому из пп.21-34, в котором набор предназначен для определения вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

36. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 2 или интерлейкин 2, слитый со стабилизирующим пептидом.

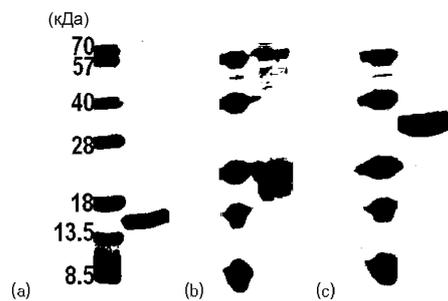
37. Набор по любому из пп.21-28, в котором средство содержит интерлейкин 15 или интерлейкин 15, слитый со стабилизирующим пептидом.

38. Набор по любому из пп.21-37, в котором образец цельной крови представляет собой образец цельной крови человека.

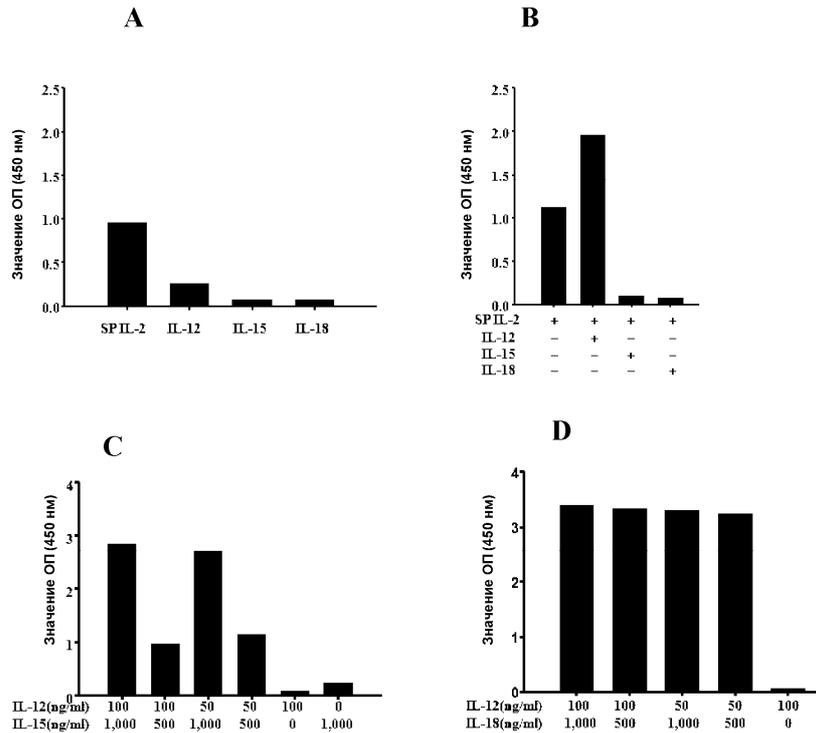
39. Набор по любому из пп.21-38, дополнительно содержащий инструкции выполнения способа по п.1.



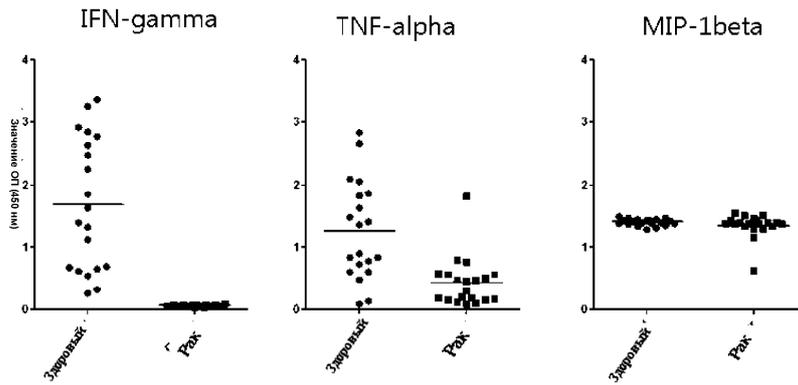
Фиг. 1



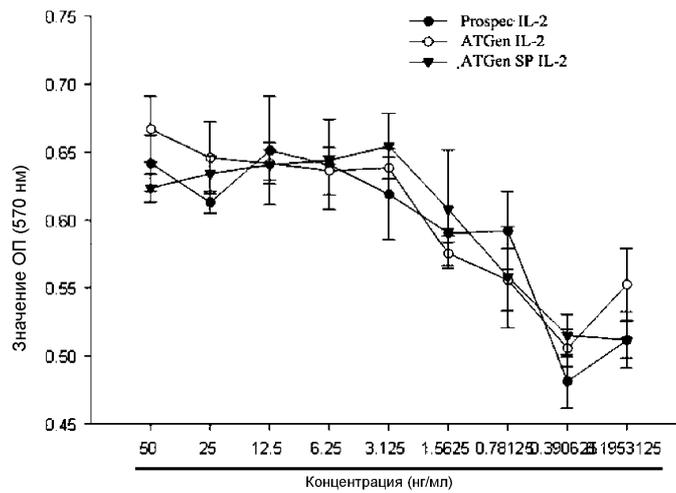
Фиг. 2



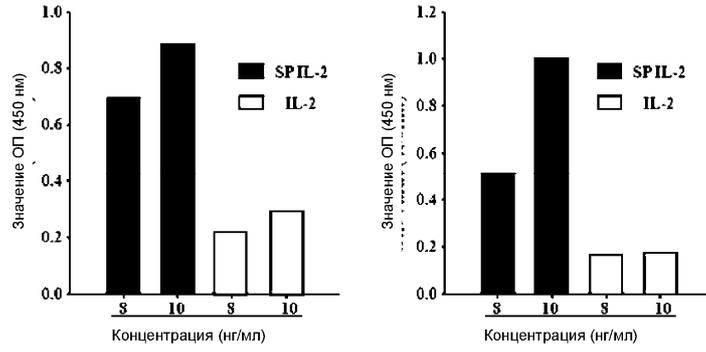
Фиг. 3



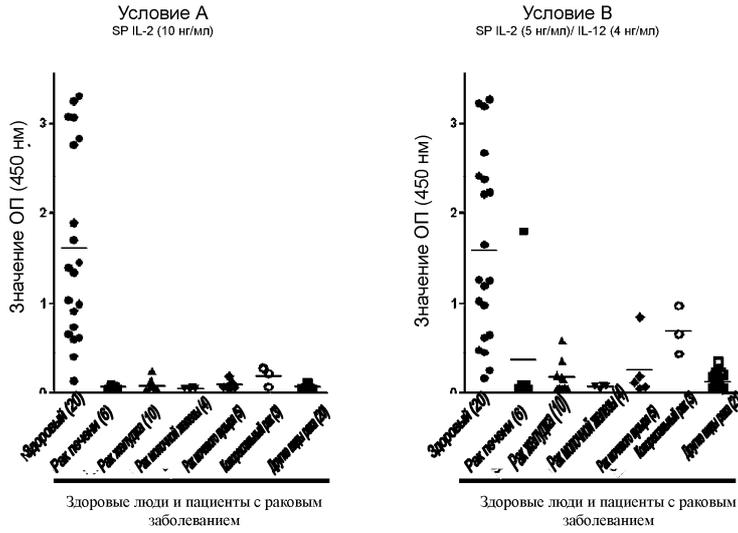
Фиг. 4



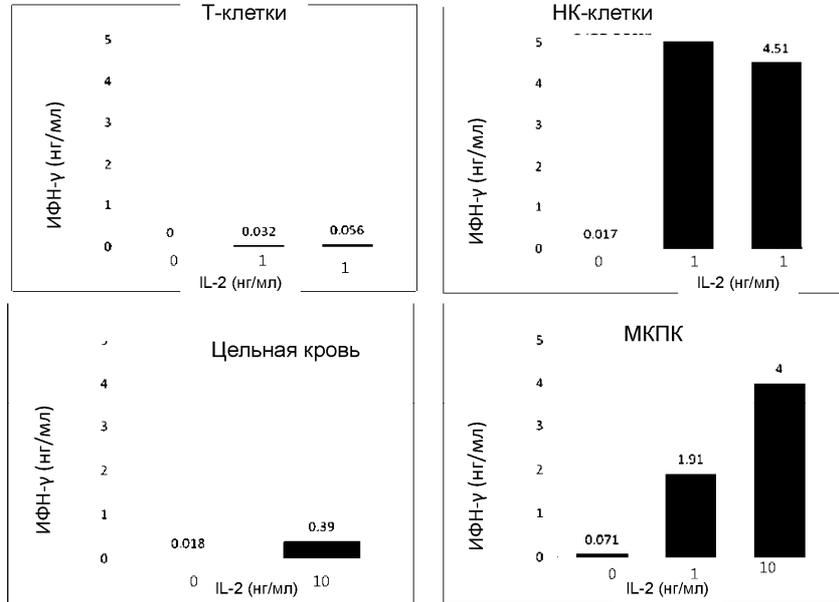
Фиг. 5А



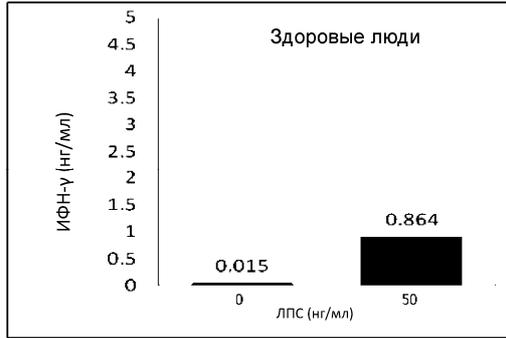
Фиг. 5B



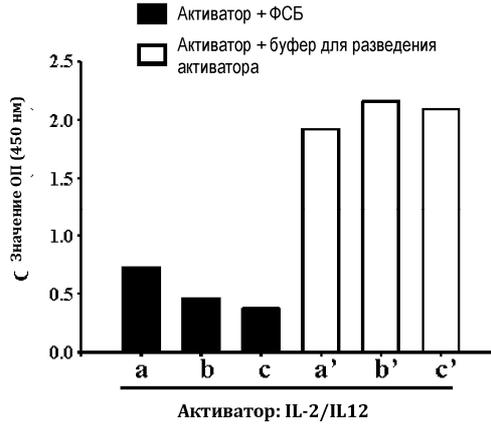
Фиг. 6



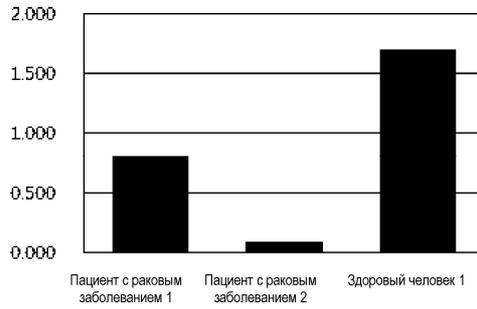
Фиг. 7



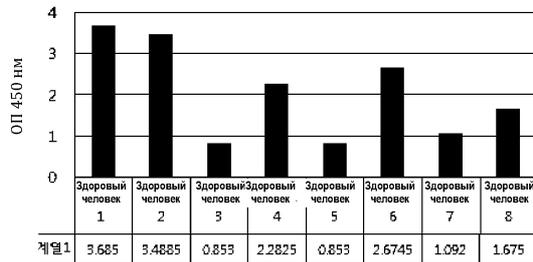
Фиг. 8



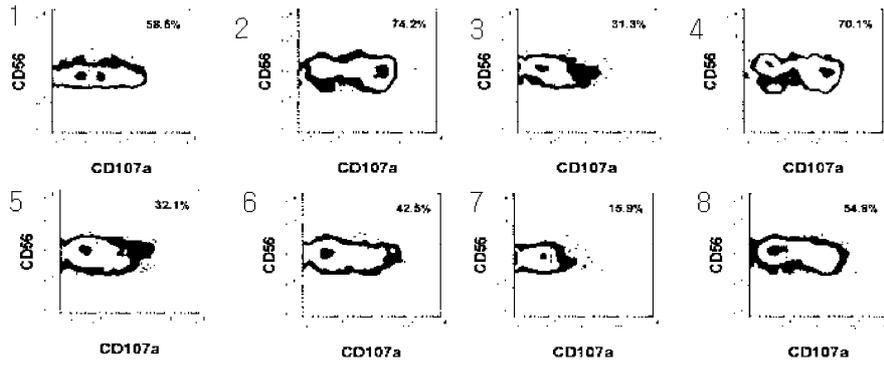
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12