

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
23 сентября 2010 (23.09.2010)

РСТ

(10) Номер международной публикации
WO 2010/107405 A1

(51) Международная патентная классификация:
C12N 15/12 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/UA2009/000011

(22) Дата международной подачи:
27 марта 2009 (27.03.2009)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
а 2009 02499 20 марта 2009 (20.03.2009) UA

(72) Изобретатель; и

(71) Заявитель : РАЗУМЕНКО, Михаил Викторович
(RAZUMENKO, Mihail Viktorovich) [UA/UA]; ул. Н.
Краснова, д. 8-А, кв. 43, Киев, 03115, Киев (UA).

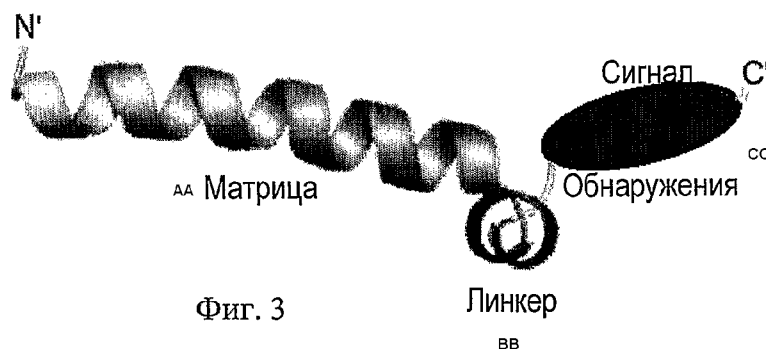
(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PEPTIDES WHICH SPECIFICALLY RECOGNIZE CELLS OF PARTICULAR
TYPES AND CAN BE USED FOR THERAPEUTIC PURPOSES

(54) Название изобретения : СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ, СПЕЦИФИЧНО РАСПОЗНАЮЩИХ
ОПРЕДЕЛЁННЫЕ ТИПЫ КЛЕТОК И ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ



AA Array
BB Linker
CC Detection signal

(57) Abstract: The invention relates to genetic engineering. The method for producing peptides which specifically recognize cells of particular types, including cells in different pathological states, involves constructing a plurality of libraries of random peptides on the basis of oligonucleotide fragments which encode said peptides by fragmenting the total RNA of cells of a particular type and cells of other types which could be used in a pathological process to influence the diagnosis and treatment thereof. Furthermore, the above-mentioned fragments are cloned in the correct orientation in a bacteriophage-based vector. The libraries are then screened in several stages using combinations of the cells of a particular type and the cells of other types to produce groups of peptides which specifically recognize cells of a selected type in the vector structure. Individual peptides in the structure of phage particles are isolated from the produced peptides and tested with the aid of combined tests in order to prove the specificity of the peptides in relation to the cells of a particular type. In order to produce pure peptides, arrays based on amino acid sequences of the peptides in the structure of phage particles are formed, the sequences of new peptides are read therefrom, these peptides are chemically synthesized, and the specific recognition of the cells of a particular type is then proven.

(57) Реферат:

[продолжение на следующей странице]

WO 2010/107405 A1



SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

— об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

— с изменённой формулой изобретения и объяснением (статья 19(1))

Изобретение относится к генной инженерии. Способ получения пептидов, специфично распознающих клетки определенных типов, в том числе в различных патологических состояниях, при котором конструируют множество библиотек случайных пептидов на основе олигонуклеотидных фрагментов, кодирующих их, путем фрагментации суммарной РНК клеток определенного типа и клеток других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс и оказывать влияние на его диагностику и терапию. При этом клонируют указанные фрагменты в правильной ориентации в векторе на основе бактериофага. Затем выполняют скрининг библиотек в несколько этапов с использованием комбинаций клеток определенного типа и клеток других типов с получением групп пептидов, специфично распознающих клетки выбранного типа в составе вектора. Из полученных пептидов, выделяют и тестируют индивидуальные пептиды в составе фаговых частиц с использованием комбинированных тестов для подтверждения их специфичности в отношении клеток определенного типа. Для получения пептидов в чистом виде создают матрицы на основе аминокислотных последовательностей пептидов в составе фаговых частиц, с которых затем считывают последовательности новых пептидов и синтезируют их химическим путем, с последующим подтверждением специфичного распознавания клеток определенного типа.

**Способ получения пептидов, специфично распознающих
определённые типы клеток и предназначенных для терапевтических целей**

5 Изобретение относится к генной инженерии, в частности к способам получения пептидов, которые способны специфично распознавать определённые типы клеток и могут быть использованы в диагностике, терапии и фармацевтических приложениях.

10 В настоящее время одной из главных проблем является повышение уровня сердечнососудистых, раковых и иммунных заболеваний. В большинстве случаев, первоисточниками таких нарушений является быстротечная неконтролируемая пролиферация тканево-клеточных структур, что затрудняет и осложняет их диагностику и терапию. Поэтому, первоочередным условием является своевременное выявление патологического состояния, разработка и доставка лекарственных пре-
15 паратов, блокирующих клеточную активность в очагах заболеваний.

Известны терапевтические ингибиторы для сосудистых гладкомышечных клеток, которые используют для подавления клеточной активности и/или уничтожения клетки путем целевой доставки терапевтических агентов в очаги активной пролиферации (см. пат. США №6515009 от 04.02.2003г., МКП А61К31/40). Для
20 ингибирования роста сосудистых гладкомышечных клеток, согласно данного патента, используются терапевтические конъюгаты, которые содержат лекарственный препарат, ассоциированный с пептидом или белком, специфическим образом связывающийся с клеточной мембраной сосудистых гладкомышечных клеток (например, моноклональные и поликлональные антитела, факторы роста, поли-
25 пептидные гормоны, цитокины и им подобные) или с элементом внутри- или внеклеточного матрикса (например, макромолекулы, распознающие рецепторы интегринов и фибронектинов, а также эпитопы коллагена и внеклеточных глико-протеинов) этих же клеток. Один из таких пептидов, например, содержит последовательность аминокислот, специфически узнающую хондроитинсульфат про-
30 теогликан, с предположительным молекулярным весом около 250 килодальтон, экспрессируемым на мембранах сосудистых гладкомышечных клетках. Такая же последовательность аминокислот находится в регионах, обуславливающих ком-

плементарность моноклонального антитела NR-AN-01 и/или его функциональных эквивалентов.

Недостатками данного изобретения является использование пептидов, которые распознают белки с выраженной экспрессией в ряде других функционально важных клеток и тканей, это ведёт к тому, что данный терапевтический конъюгат может связываться и с другими типами клеток не гладкомышечного происхождения, как, например, клетки нейроглии, костной ткани и другие, что приводит к нежелательной аккумуляции лекарственного препарата в данных клетках и побочному цитотоксическому эффекту (нежелательной клеточной гибели). Кроме того, при использовании антител в качестве ведущих составляющих конъюгатов, их размер, ввиду плотного внеклеточного матрикса, может стать препятствием при проникновении конъюгата в очаг пролиферации, причем кросс-реактивность антител к другим молекулярным структурам снижает их специфичность.

Известен также способ целенаправленной доставки пептидов к сосудистым гладкомышечным клеткам *in vitro* и *in vivo*, с целью доставки лекарственных препаратов к рестенозной бляшке посредством пептидов, встроенных в фаговые частицы, которые связываются с пролиферирующими сосудистыми гладкомышечными клетками из библиотеки синтетических 15-ти членных пептидов, сконструированной случайным образом (см. статью Ingrid N. Michon et al. "Targeting of peptides to restenotic vascular smooth muscle cells using phage display *in vitro* and *in vivo*" в журнале "Biochimica et Biophysica Acta" вып. №1591, 2002г., стр.87-97). Отобранные пептиды посредством многократного повторения одноэтапного скрининга, в дальнейшем проходят подтверждение специфичности, исключительно, методом иммуноферментного анализа и визуализируются с помощью иммунофлюоресценции, при этом обнаруживают два пептида с консервативной аминокислотной последовательностью, такие как 5G6 (N'-CNIWGVVLSWIGVFPEC-C') и 5E5 (N'-CESLWGGLMWTIGLSDC-C').

Недостатками данного способа являются использование одной исходной библиотеки на основе синтетических случайно ориентированных пептидов, не имеющих аналогов в природе, что определяет их первично низкую специфичность и селективность, а также высокую иммуногенность. Кроме того, много-

кратное повторение одноэтапного скрининга приводит к ослаблению специфических взаимодействий и наращиванию неспецифических.

В основу заявленного изобретения поставлена задача, создать способ получения пептидов, специфично распознающих определённые типы клеток с высокой степенью селективности, которые предназначены для терапевтических целей.

Поставленная задача достигается путем осуществления нового способа получения пептидов, специфично распознающих определённые типы клеток, при котором предусматривают конструирование фаговой библиотеки случайных пептидов на основе кодирующих их олигонуклеотидных фрагментов, её скрининг для получения пептидов, связывающихся с определённым типом клеток, и подтверждают специфичность отобранных пептидов, при этом, согласно изобретению,

- олигонуклеотидные фрагменты, кодирующие случайные пептиды, получают реакцией обратной транскрипции с использованием случайных праймеров и суммарных РНК клеток определённого типа и клеток других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его диагностику и терапию,

- указанные олигонуклеотидные фрагменты встраивают в бактериофаговые векторы в правильной ориентации и используют для создания фаговых библиотек случайных пептидов для клеток всех типов, использованных для выделения суммарных РНК,

- скрининг полученных фаговых библиотек случайных пептидов проводят в два этапа, на первом из которых отбирают пептиды, способные связываться с клетками определённого типа, а на втором – из отобранных на первом этапе пептидов отбирают пептиды, не связывающиеся с клетками других использованных типов,

- подтверждают специфичность пептидов в составе бактериофаговых частиц к клеткам определённого типа, используя комбинации различных тестов,

- определяют первичные последовательности олигонуклеотидных фрагментов кодирующих пептиды в составе отобранных фаговых частиц, и транслируют

их в аминокислотные последовательности с дальнейшим проведением анализа полученных последовательностей,

- конструируют матрицы из аминокислотных последовательностей пептидов, на основе их физико-химических характеристик, включающие линкер и сигнал обнаружения,

- считывают последовательности новых пептидов с матриц и синтезируют такие пептиды химическим путём, с последующим подтверждением специфичности полученных пептидов в отношении клеток определённого типа.

При осуществлении данного способа получают пептиды, специфично распознающие клетки определенных типов, которые могут использоваться для доставки лекарственных препаратов в места непосредственного их действия, с целью профилактики и/или терапии нарушений, связанных с функционированием клеток определённых типов, или для непосредственного использования полученных пептидов как лекарственной формы в терапевтических приложениях. Кроме того, использование таких пептидов, или их фрагментов, позволит диагностировать нарушения функционирования клеток определённых типов и прогнозировать их лечение.

Заявленный способ позволяет получать высокоспецифичные и высокоселективные пептиды к клеткам определенного типа.

Способ получения пептидов поясняется схемами и иллюстрациями, где:

фиг.1 – показано синтез кДНК и конструирование библиотек;

фиг.2 – изображена схема одно- и многошагового скрининга;

фиг.3 – изображена схема пептидного конструкта (матрицы).

Способ получения пептидов осуществляют таким образом.

Вначале, проводят отбор и разделение клеточных популяций на типы: клетки, которые должны быть специфично распознаны пептидами, и клетки, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию, распознавание которых при этом является не желательным. Затем, конструируют серии библиотек случайных пептидов с использованием суммарной клеточной РНК в векторе вирусного типа на основе ДНК бактериофагов.

Сначала изолируют суммарную РНК общеизвестными методами с адаптационными модификациями, с последующей, в случае необходимости, очисткой её и выделением фракции матричной РНК. Качество такой РНК анализируют и в дальнейшем, используют РНК в реакциях обратной транскрипции, направляемых праймерами, как случайного происхождения, так и комплементарными к поли А участку матричных РНК.

На этом этапе осуществляют первичное разделение суммарной клеточной РНК посредством контролируемого синтеза фрагментов кДНК ограниченных в размере и гетерогенности, что достигается использованием различных концентраций ионов в реакционной смеси, комбинацией праймеров, количеством исходного материала и режимов температур.

Вторичное разделение клеточной РНК осуществляют на этапе фракционирования и очистки полученных молекул кДНК для чего используют гель-фильтрацию таким образом, что после элюции пул кДНК молекул состоит из 2-х частей: фракции с количеством нуклеотидных звеньев менее 500 и фракции состоящей из молекул размером более 500 пар оснований.

Такое разделение позволяет в первом случае, создание библиотек направленных на определение точных мест взаимодействия молекулы пептида с молекулами на поверхности клеток распознаваемого типа, а во втором случае, идентифицировать фрагмент нуклеиновой кислоты, ответственный за синтез данного пептида или белкового фрагмента.

Далее, на стадии встраивания фрагментов кДНК в бактериофаговый вектор в правильной ориентации, полученные в результате деления и синтеза, молекулы кДНК легируют с олигонуклеотидными линкерами, синтетически синтезированными и содержащими места узнавания для эндонуклеаз рестрикции, используемых для обработки и подготовки вектора для клонирования. Для этого, концы кДНК вначале обрабатывают с помощью ДНК полимеразы и только потом, такие фрагменты легируют с линкерами и инкубируют с эндонуклеазами рестрикции. Используя данные линкеры, становится возможным получить фрагменты кДНК, которые содержат на разных концах места узнавания для используемых эндонуклеаз рестрикции, в таком расположении, что могут быть беспрепятственно клонированы в вектор в определенной ориентации (смысловое клонирование).

Одновременно с этим, бактериофаговый вектор обрабатывают эндонуклеазами рестрикции, с целью получения фрагментов пригодных для легирования с синтезированными фрагментами кДНК. Полученные, в результате легирования фрагментов кДНК и молекул вектора, рекомбинантные молекулы, упаковывают *in vitro* и иницируют экспрессию данного фрагмента посредством одного цикла репликации. Затем, определяют количество рекомбинантов в библиотеке и абсолютное число частиц.

После этого, проводят скрининг (отсев) таких библиотек, используя комбинации клеток определённого типа и клеток других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию. При этом скрининг осуществляют многократным повторением раундов инкубации с клетками, отмывок фаговых частиц, которые не связались с клетками, растворами различной ионной силы и растворами различной способности нарушать белок - белковые взаимодействия, с последующей элюцией и амплификацией искомым фаговых частиц. Причем, в случае прямого скрининга, определёнno - рассчитанное количество фаговых частиц в буфере, сначала инкубируют с материалом, который используют для культивирования клеток, а потом остаточную фракцию (супернатант), содержащую свободные фаги, переносят на клетки определённого типа. В случае, многошагового скрининга, а именно, использования комбинаций нескольких типов клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию, супернатант после инкубации с материалом направляют на эти клетки, после которых супернатант направляют либо на клеток распознаваемого типа, либо на следующий тип клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию, а потом супернатант инкубируют с клетками распознаваемого типа. Аналогично проводят скрининг, если используются клетки определённого типа и клетки других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию, в различных структурно-функциональных состояниях.

Таким образом, результатом многошагового скрининга является группа пептидов в составе фаговых частиц, обладающая выраженной специфичностью в отношении клеток определённого типа.

Далее из вышеуказанных групп, выделяют индивидуальные фаговые частицы и их тестируют.

В одном случае, тестируемый фаг нарабатывают (наращивают) в необходимом количестве, очищают и испытывают как первое антитело в прямом иммуноферментном анализе (ИФА), где антигеном выступают культивируемые клетки, определённых типов в различных функциональных состояниях.

При исследовании большого количества фаговых частиц, проводят микро-селекцию. Для этого, исходную группу рассеивают до получения индивидуальных бляшек, которые затем элюируют буфером для инкубации в ИФА и используют непосредственно, как источник первого антитела в ИФА, без предварительного наращивания и очистки.

В другом случае, индивидуальный клон аналогично первому случаю, амплифицируют, очищают и инкубируют одновременно с клетками распознаваемого типа и клетками, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию. После чего, отмывают клетки, элюируют связанные частицы и определяют их титр, затем сравнивают его с титром, полученным для клеток другого типа.

В третьем случае, используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), в анализе специфичности пептидов, в составе фаговых частиц, при этом, несколько фагов очищают и смешивают в одинаковых количествах, потом инкубируют с клетками распознаваемого типа и клетками, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию, элюируют, рассеивают до отдельных бляшек, которые отбирают парами, выделяют ДНК и используют её в качестве матрицы для ПЦР. Так определяют количественное распределение и степень специфичности пептидов, в составе фаговых частиц.

Также определяют стабильность пептидов и способность интернализироваться в составе фаговых частиц, которые проверяют, инкубируя фаг с клетками

определённого типа при различных режимах температуры и времени, с последующим элюированием жизнеспособных фагов.

Для получения индивидуальных пептидов распознающих клетки определённого типа вне фаговых частиц, ДНК бактериофага выделяют, и посредством полимеразной цепной реакции амплифицируют олигонуклеотидные фрагменты, кодирующие пептиды в составе фаговой частицы, специфично распознающие клетки определённого типа. Первичные нуклеотидные последовательности этих фрагментов определяют методом дидезокси-секвенирования по Сэнгеру используя автоматический секвенатор. Полученные нуклеотидные последовательности транслируют в рамке считывания для получения аминокислотных последовательностей пептидов находящихся в составе фаговых частиц. Далее проводят компьютерный анализ полученных аминокислотных последовательностей, используя общедоступные пакеты программ для анализа биологических макромолекул, при этом определяют физико-химические и структурные характеристики пептидов.

На основе данных компьютерного анализа, конструируют матрицы из аминокислотных последовательностей пептидов специфично распознающих клетки определённых типов. Для чего, на первом этапе аминокислотные последовательности группируют в короткие (до 5 аминокислотных звеньев) матрицы, которые на втором этапе объединяют в длинные матрицы (не менее 15 аминокислотных звеньев) комбинируя минимум по три и более коротких матриц. На завершающем этапе к полученным матрицам из аминокислотных последовательностей добавляют последовательности линкера и сигнала обнаружения. Для получения пептидов в чистом виде, с конструированных матриц считывают последовательности новых пептидов и синтезируют такие пептиды химическим путём. Далее пептиды очищают до готовности, с последующим подтверждением специфичности полученных пептидов к клеткам определённых типов.

Примеры конкретного выполнения заявленного способа.

Пример 1. Выбор клеточных популяций.

Для получения пептидов высокоспецифичных к например, сосудистым гладкомышечным клеткам (СГМК), используют их в качестве клеток распознаваемого типа, а клетки, взаимодействующие с ними, как в составе стенки кровеносного сосуда (эндотелиальные), так и переносимые током крови (фибробласты)

используют в качестве клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию. Клетки карциномы цервикального канала – HeLa, и клетки карциномы печени – Нер-G2 также используют, как клетки, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Культуру СГМК инициируют из магистральных кровеносных сосудов пациентов с патологиями сердечнососудистой системы. Целый ряд клеточных линий доступен в виде коммерческих препаратов. Например, параллельно культурам клеток, полученным при обработке артерий и вен пациентов, использовали гладкомышечные клетки коронарной артерии (Cell Systems GmbH, Lot# 17151, Catalog # CC-2583). Препараты исходной культуры СГМК являются первичными в своём происхождении, и имеют ограниченное количество дубликаций, что лимитирует количество последующих пересевов. Поэтому, во всех случаях инициируют культуры, для последующего исследования используя образцы клеток, имеющих не более чем 6 делений. Для культивирования используют пластиковые флаконы, произведенные исключительно для работы с культурами тканей, общей площадью поверхности для роста от 25 до 182 квадратных сантиметров (например, флаконы типов -T25, T75, T182).

Сосудистые гладкомышечные клетки культивируют, используя питательную среду, которая состоит на 1/3 из каждого следующего компонента – Waymouth (GIBCO BRL Cat. # 31220-023), F12 (GIBCO BRL Cat. # 31220-023), SMCBM (Promocell Cat. # C-22260). Такую среду дополняют, предварительно инактивированной инкубацией 30 минут при температуре 56 °C на водяной бане, сывороткой плода коровы (GIBCO BRL Cat. # CC-4102) до конечной концентрации - 15%, а также раствором пенициллина/стрептомицина (GIBCO BRL Cat. # 15140-114) до конечной концентрации -1,5%. Среду, содержащую в своём составе сыворотку плода коровы, называют обогащённой. Сосудистые гладкомышечные клетки, заблокированные на стадии роста, культивируют, используя обеднённую питательную среду, т.е. без добавления сыворотки плода коровы, но с добавлением раствора пенициллина/стрептомицина в вышеуказанной концентрации. Для блокирования сосудистых гладкомышечных клеток на стадии роста, их сначала

культивируют, пока размер монослоя не достигнет 90% от всей площади роста, используя обогащённую питательную среду, и лишь, затем проводят замену обогащённой питательной среды на обеднённую и продолжают инкубацию в течение 72 часов, проводя замену старой питательной среды на новую, каждые 24 часа.

5 Эндотелиальные клетки культивируют, используя питательную среду - EGM-2 (Clonetics Company, Cat. # CC-3202), дополненную прилагающимся к ней пакетом комплементации – EGM-2 MV (Clonetics Company, Cat # CC-4147), который содержит факторы роста, гормоны и инактивированную сыворотку плода ко-
10 10%. Эндотелиальные клетки иницируют из препарата (Promocell Cat. # CC-2519). Блокируют эндотелиальные клетки на стадии роста аналогично тому, как в случае сосудистых гладкомышечных клеток.

 Фибробласты культивируют, используя питательную среду, основой которой является стандартная среда DMEM (GIBCO BRL) дополненная инактивиро-
15 ванной сывороткой плода коровы до конечной концентрации 10%, и раствором пенициллина /стрептомицина до конечной концентрации 1,5 %. Иницируют культуру клеток фибробластов из препарата пациентов с патологиями сердечно-сосудистой системы и блокируют также, как это описано для сосудистых гладко-мышечных клеток.

20 Клетки HeLa 3T3 и клетки Нер-G2 представляют собой иммортализованные линии, поэтому практически любой доступный образец клеток используют для инициирования культуры, однако, стараются использовать клетки прошедшие не более 100 делений. Для культивирования этих клеток используют питательную среду на основе, какой- либо из MEM – композиций (GIBCO BRL), дополненную
25 сывороткой плода коровы в конечной концентрации 15-20 % (что определяется желаемыми скоростями роста) и раствором пенициллина/стрептомицина в конечной концентрации 1,5 %. Для получения достоверных результатов скрининга данные типы клеток также подвергают культивированию с использованием обеднённой питательной среды, имитируя блокирование роста сходное с таковым на-
30 блюдаемым для первичных типов клеток (СГМК, эндотелиальные и фибробласты).

Пример 2. Выделение РНК и реакции обратной транскрипции (см. фиг. 1)

На основе первичного отбора клеточных популяций выделяют РНК, как из клеток определённого типа, так и из клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

5 Клетки всех типов наращивают в течение 5-7 суток, используя флаконы типа T75 и 18 мл питательной среды, замену которой производят каждые 24 часа. Сосудистые гладкомышечные клетки культивируют в 40 флаконах, из расчёта $3,5 \cdot 10^5$ клеток на флакон. Эндотелиальные клетки культивируют в 20 флаконах, из расчёта $3 \cdot 10^5$ клеток на флакон. Клетки HeLa и Hep-G2 культивируют в 20
10 флаконах, из расчёта $1,6 \cdot 10^5$ клеток на флакон. Клетки интенсивно промывают 2 раза, используя 12 мл буфера HBSS (сбалансированный солевой раствор по Хэнксу) каждый раз, далее обрабатывают в течение 3 минут, используя 6 мл раствора содержащего 0,05% трипсина и 0,53 мМ ЭДТА (этилендиаминтетраацетата), и нейтрализуют добавлением 9 мл буфера HBSS. Собирают клетки центрифугированием в течение 10 минут на $3000 \cdot g$, и промывают 3 раза, используя 20 мл буфера HBSS. Число клеток определяют с помощью камеры для счёта клеток, для этого смешивают 50 мкл суспензии клеток с равным объёмом 15%-ого раствора трипанового голубого, являющегося витальным красителем. Число живых клеток фиксируют и рассчитывают общее число клеток в суспензии.

20 В случае использования методов грубой экстракции гуанидинизотиоцианатом, как с последующим осаждением солями лития, так и без осаждения, клетки концентрируют центрифугированием, супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют интенсивно в буфере для лизиса (5,25М гуанидинизотиоцианата; 50мМ Трис-Cl, pH 6,4; 20мМ ЭДТА; 1% Тритон X-100; 0,1М 2-меркаптоэтанола) из расчёта 1 мл на 10^7 клеток. К данному раствору добавляют 0,1 объёма 2М р-ра ацетата натрия, 1 объём р-ра водного фенола, 0,3 объёма смеси хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 24:1, по объёму) и интенсивно перемешивают в течение 30-60 секунд. Инкубируют полученную смесь 15 минут при температуре 0°C , после чего центрифугируют в течение 30 минут на $8000 \cdot g$ при температуре 4°C , с
25 целью разделения водной и органической фаз. Водную фазу после осаждения переносят в новую пробирку и добавляют к ней 0,6 объёма изопропилового спирта, предварительно охлаждённого до температуры -20°C , перемешивают и помещают
30

на период не менее 60 минут в охладитель с температурой -70°C . После инкубации раствор центрифугируют 30 минут на $12000 \times g$ при температуре 4°C , супернатант тщательно удаляют, а осадок промывают несколько раз центрифугированием по 5 минут в присутствии 1 мл 70%-го раствора этилового спирта. Полученный осадок растворяют в 0,4 мл воды обработанной диэтилпиروкарбонатом (ДЭПК).

В случае применения методов мягкой экстракции с использованием протеиназы К, клетки концентрируют центрифугированием, супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют интенсивно в предварительно охлаждённом буфере для лизиса (0,15М хлорида натрия; 10мМ Трис-Cl, pH 8,5; 0,05% NP-40; 0,01% 3-карбоксиауриновой кислоты; 0,1М 2-меркаптоэтанола) из расчёта 1 мл на 5×10^7 клеток. Затем, смесь центрифугируют 2 минуты на $12000 \times g$ и температуре 4°C , супернатант переносят в новую пробирку и добавляют равный объём буфера для протеиназы К (0,2М Трис - Ацетат; 0,3М натрия ацетат; 0,05М ЭДТА, pH 7,5; 2% (по весу) натрия додецилсульфата) содержащего 400 мг/мл протеиназы К, и инкубируют 60 минут при температуре 37°C . Далее, добавляют 1 объём смеси фенол – хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1) и интенсивно перемешивают 5 минут при комнатной температуре. После чего, смесь центрифугируют 2 минуты на $12000 \times g$ при комнатной температуре, полученную водную фазу переносят в новую пробирку и повторяют экстракцию смесью фенол – хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1) несколько раз. К водной фазе, полученной в результате экстракции, добавляют 2,5 объёма абсолютного этилового спирта, интенсивно перемешивают, и осаждают РНК, помещая образец на 30 минут в охладитель с температурой -70°C . Далее раствор, содержащий РНК, центрифугируют 10 минут на $12000 \times g$ при температуре 4°C , и полученный осадок промывают 3 раза центрифугированием 5 минут на $12000 \times g$, в присутствии 700 мкл 70%-го раствора этилового спирта. Осадок осушают 2,5 минуты под вакуумом и растворяют в 0,4 мл воды, обработанной ДЭПК.

Полученный в результате первичной экстракции раствор суммарной клеточной РНК, подвергают обработке дезоксирибонуклеазой первого типа, с целью удаления фрагментов ДНК, способных попасть в раствор РНК в процессе ее экстракции и способных затруднять дальнейшее фракционирование такой РНК и ис-

пользование её в реакциях обратной транскрипции. Для этого, к 0,4 мл раствора, содержащего 4 мг/мл РНК, добавляют 12 мкл (480 единиц) ингибитора рибонуклеаз (Invitrogen, Cat # 10777-019), 50 мкл 10-ти кратного стандартного буфера для дезоксирибонуклеазы и 50 мкл (500 единиц) дезоксирибонуклеазы первого типа (GIBCO BRL). Затем, полученную смесь инкубируют 2 часа при температуре 37⁰С, и реакцию останавливают одновременным добавлением 0,1 объёма 3М р-ра ацетата натрия (рН 5,2), 1,1 объёма раствора водного фенола, 0,3 объёма смеси хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 24:1). Раствор интенсивно перемешивают в течение 1 минуты, инкубируют 15 минут при температуре 0⁰С и центрифугируют 10 минут на 12000*g, при температуре 4⁰С. Водную фазу переносят в новую пробирку и осаждают РНК с помощью абсолютного этилового спирта, как описано выше.

Для выделения фракции матричной РНК (мРНК), 1-2 мг суммарной РНК растворяют в 5 мл буфера для нанесения (прилагается к колонке), и наносят на колонку, содержащую олиго - (дТ) - целлюлозу (Sigma, Cat #03131), предварительно промытую 3 раза 1 мл буфера для нейтрализации (прилагается к колонке). После экстракции колонку промывают 5 раз, используя 1 мл буфера для нейтрализации и связанную мРНК элюируют 1,5 мл буфера для элюции. В дальнейшем, мРНК, содержащуюся в полученном растворе, осаждают добавлением 150 мкл р-ра 3М ацетата натрия (рН 5,2) и 3,75 мл абсолютного этилового спирта.

Пример 3. Синтез кДНК и фрагментация суммарной РНК.

С целью получения молекул кДНК для клонирования, суммарную РНК и/или мРНК используют в реакциях обратной транскрипции направляемых РНК – зависимой – ДНК - полимеразой.

Для этого, смешивают 0,001-5,000 мг суммарной РНК и 1 мкл праймера (500 мкг олиго - (дТ) или 0,050 - 0,250 мкг случайного связывающегося праймера, 5'-ТТNNNNNN-3'), к которым добавляют 1 мкл 10 мМ р-ра дезоксирибонуклеотидов (10 мМ каждого в нейтральном растворе) и доводят объём смеси до 12 мкл используя дважды дистиллированную воду, обработанную диэтилпиروкарбонатом. Полученную смесь инкубируют 5 минут при температуре 65⁰С, быстро охлаждают и добавляют 4 мкл 5-ти кратного буфера для синтеза первичной цепи кДНК (250 мМ Трис - Cl, рН 8,3; 375 мМ калия хлорида; 15 мМ хлорида магния),

2 мкл 0,1 М р-ра дитиотриэтола (ДТТ), 1 мкл (40 единиц) ингибитора рибонуклеаз. Содержимое пробирки интенсивно перемешивают и инкубируют 2 минуты при температуре 42⁰С, после чего, добавляют 1 мкл (200 единиц) Superscript II РНК – зависимой - ДНК-полимеразы (GIBCO BRL, Cat. #18064-014) интенсивно перемешивают и инкубируют 60 минут при температуре 42⁰С. Реакцию обратной транскрипции останавливают посредством инактивации фермента, для чего смесь инкубируют 15 минут при температуре 70⁰С. С целью удаления фрагментов РНК комплементарных новосинтезированным молекулам кДНК и затрудняющих последующую амплификацию кДНК с помощью ПЦР, к раствору добавляют 1 мкл (2 единицы) рибонуклеазы Н и инкубируют 20 минут при температуре 37⁰С.

На этом этапе осуществляют первичное разделение суммарной РНК посредством контролируемого синтеза фрагментов кДНК ограниченных в размере и гетерогенности, что достигается использованием различных концентраций ионов в реакционной смеси, комбинацией праймеров, количеством исходного материала и режимов температур.

Синтез 2-ой цепи кДНК осуществляют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), для чего используют не более 10% конечного раствора после обработки рибонуклеазой Н. Собирают смесь последовательным добавлением 5 мкл 10-ти кратного буфера для ПЦР (200 мМ Трис- Cl, рН 8,4; 500 мМ хлорида калия), 1,5 мкл 50 мМ р-ра хлорида магния, 1 мкл 10 мМ р-ра дезоксирибонуклеотидов, 0,5 мкл (2,5 единиц) Taq -ДНК-полимеразы, 2 мкл р-ра кДНК (конечный продукт реакции синтеза первичной цепи кДНК), 38,1 мкл воды обработанной ДЭПК. Раствор интенсивно перемешивают и инкубируют в течение 2 минут при температуре 94⁰С. Затем проводят 15-40 стандартных циклов амплификации ПЦР.

С целью получения фрагментов пригодных для клонирования, концы молекул кДНК обрабатывают и легируют с синтетическими олигонуклеотидными линкерами, которые содержат в своём составе место узнавания для эндонуклеазы рестрикции – Eco R1 и частично место узнавания для эндонуклеазы рестрикции – Hind III. Это позволяет получить после обработки таких линкеров соответствующими эндонуклеазами рестрикции, молекулы кДНК способные эффективно легироваться с 5'- конца только с Eco R1 обработанной ДНК, и с 3'- конца только с

Hind III обработанной ДНК. Для этого, к 20 мкл (не более 10 мкг) раствора молекул кДНК добавляют 3 мкл 10-ти кратного буфера для T4 ДНК-полимеразы (200 mM Трис-Cl, pH 8,4; 500 mM хлорида калия), 1,5 мкл 100 mM р-ра ДТТ, 3 мкл 1 mM р-ра дезоксирибонуклеотидов, и 1,0 мкл (1,5 единиц) T4 -ДНК-полимеразы, и

5 доводят конечный объём раствора до 30,0 мкл, используя дважды дистиллированную воду обработанную ДЭПК. Раствор медленно перемешивают и инкубируют в течение 20 минут при температуре 11⁰С. Реакцию останавливают добавлением равного объёма смеси фенол – хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1) и затем ДНК, которая содержится в водной фазе, осаждают добавлением растворов ацетата натрия и абсолютного этилового спирта как описано

10 выше. Полученный осадок, который содержит молекулы кДНК, растворяют в 10 мкл дважды дистиллированной воды обработанной ДЭПК. Олигонуклеотидные линкеры фосфорилируют посредством инкубации с T4 - полинуклеотидкиназой, непосредственно перед использованием в реакции легирования. Для этого собирают смесь последовательным добавлением к 10 мкл р-ра молекул кДНК (с предыдущего этапа), 2 мкл 10-ти кратного буфера для легирования (10x= 200 mM

15 Трис-Cl, pH 7,6; 50 mM хлорида калия), 2 мкл 1 mM р-ра АТФ, 2 мкл (100 пикомоль) р-ра олигонуклеотидных линкеров (5'-GCTTGAATTCAAGC-3' / 3'-CGAACTTAAGTTTCG-5'), 2 мкл 100 mM р-ра ДТТ, 2,0 мкл (5 единиц) T4 - полинуклеотидкиназы. Раствор перемешивают и инкубируют в течение 5 минут при температуре 37⁰С. Затем добавляют 6-8 единиц T4 - ДНК - лигазы и инкубируют в течение 6 - 20 часов при температуре 16⁰С.

Далее молекулы кДНК расщепляют с помощью 2-х эндонуклеаз рестрикции – Hind III и EcoR1. Для этого к раствору кДНК, добавляют 10 мкл 10-ти кратного

25 буфера для эндонуклеазы рестрикции Hind III, и 10 мкл (100 единиц) эндонуклеазы рестрикции Hind III (Invitrogen), объём такой смеси доводят до 100 мкл с помощью дважды дистиллированной воды. Полученную смесь инкубируют в течение 2-х часов при температуре 37⁰С. Затем добавляют 10 мкл 10-ти кратного буфера для эндонуклеазы рестрикции Eco R1 и 10 мкл (100 единиц) эндонуклеазы рестрикции Eco R1 (Invitrogen), и снова инкубируют в течение 4 часов при

30 температуре 37⁰С. Реакцию останавливают добавлением равного объёма смеси фенол – хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1) и затем ДНК,

которая содержится в водной фазе, осаждают добавлением растворов ацетата натрия и абсолютного этилового спирта как описано выше.

Вторичное разделение суммарной РНК осуществляют на этапе фракционирования и очистки полученных молекул кДНК, для чего используют гель-фильтрацию. Хроматографическую колонку, содержащую частицы сефарозы определённого размера промывают 5 раз, используя 1 мл буфера для нейтрализации каждого раз. Наносят разделяемый материал, популяцию кДНК, в объёме 1 мл и собирают фракции по 25 мкл.

Пример 4. Клонирование и создание множества библиотек

Создание библиотек проводят по одной модели, как для клеток определённого типа, так и для клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Для этого используют, например, ДНК бактериофага T7 (Novagen, T7 Select 10-3 вектор), обработанную с использованием 2-х эндонуклеаз рестрикции – Eco R1 и Hind III, т.е. того же типа, которые использовались для обработки концов кДНК. Раствор молекул ДНК вектора и раствор молекул кДНК смешивают в отношении 1:3, в пересчёте на моль вещества, добавляют эквивалентное количество T4 - ДНК – лигазы (GIBCO BRL) и инкубируют не более 28 часов при температуре 16 °С. Реакцию останавливают добавлением равного объёма смеси фенол – хлороформ - изоамиловый спирт (в соотношении 25:24:1), и затем ДНК, которая содержится в водной фазе, осаждают добавлением растворов ацетата натрия и абсолютного этилового спирта как описано выше.

Полученные рекомбинантные молекулы кДНК, в количестве не более 1 мкг, смешивают с 250 мкл р-ра упаковочных белков бактериофага и инкубируют в течение 5 минут при температуре 0°С. Затем добавляют питательную среду и продолжают инкубацию ещё 60 минут при температуре 37°С.

Пример 5. Амплификация бактериофагов.

Бактериофаг T7 культивируют, используя штамм *E.coli* BLT5403 в качестве хозяина. При этом амплификацию проводят несколькими путями.

В одном случае, микроамплификация, единичную бляшку или элюат после скрининга, или какое-либо другое малое количество бактериофагов, растворяют в 1 мл питательной среды, приготовленной по методу Лурия – Бертани (ЛБ). Затем

добавляют 1 мл культуры штамма-хозяина с оптической плотностью 0,4-0,6 при длине волны 600 нм ($ОП_{600}=0,4-0,6$), которую иницируют в 50 мл питательной среды ЛБ из 0,5 мл суспензии бактерий, предварительно культивированных в течение 16 часов, и наращивают в течение 2-3 часов. Смесь фагов и бактерий общим объемом 2 мл инкубируют при температуре 37⁰С и 200 оборотах в минуту на шейкере в течение 3-4 часов, наблюдая полный лизис, выражающийся просветлением содержимого пробирки.

В другом случае, макроамплификацию проводят, используя колбы посредством инокуляции необходимого числа фагов в 135 мл культуры штамма-хозяина ($ОП_{600}=0,4-0,6$) и последующим ростом в течение 4-5 часов до момента полного лизиса.

К лизированным культурам добавляют 0,1 объема 5М р-ра хлорида натрия, интенсивно перемешивают 30 секунд и центрифугируют в течение 3 минут на 7000*g и при температуре 4⁰С. Супернатант переносят в новую пробирку и добавляют 1/6 объема раствора, содержащего 20% полиэтиленгликоля и 2,5М хлорида натрия, интенсивно перемешивают, и инкубируют не менее 3 часов при температуре 0⁰С. Далее, раствор центрифугируют 10 минут на 8000*g, а осадок, содержащий фаги растворяют в 1 мл буфера TBS (Трис – Боратный Буфер) и снова осаждают фаговые частицы добавлением раствора полиэтиленгликоля - хлористого натрия с последующей инкубацией и центрифугированием в течение 10 минут на 12000*g и при температуре 4⁰С. Полученный осадок растворяют в 0,2 мл буфера TBS.

Пример 6. Скрининг (см. фиг.2)

Скрининг библиотек осуществляют, как многократным повторением одношаговой процедуры, так и с использованием многошаговой комплексной процедуры, включающей селекцию на комбинациях различных типов клеток, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Для этого иницируют культуру сосудистых гладкомышечных клеток в чашках Петри диаметром 60 мм из расчёта 64000 клеток на чашку и растят в течение 48 часов. Одновременно, в аналогичных чашках иницируют культуры эн-

дотелиальных клеток, фибробластов, HeLa, Herp-G2, соответственно в количествах - 48000, 24000, 16000, 16000 клеток на чашку, и растят в течение 48 часов.

Клетки промывают интенсивно 5 раз по 5 минут, используя каждый раз 3 мл буфера HBSS.

- 5 При использовании одношаговой процедуры, 10^{10} фаговых частиц из любой библиотеки, растворяют в 2 мл буфера HBSS и инкубируют 20 минут с преинкубационным материалом (пластик). После этого, верхнюю фазу, содержащую не связавшиеся с пластиком фаги, переносят на предварительно промытые сосудистые гладкомышечные клетки и инкубируют 40 минут при температуре 4°C .
- 10 После инкубации, с целью удаления несвязанного материала, клетки интенсивно отмывают 5 раз по 5 минут, используя каждый раз 3 мл буфера HBSS, с последующей элюцией специфично связывающихся фагов с помощью 1 мл буфера для элюции, который содержит в своём составе не более чем 1,0 % додецилсульфата натрия, или с помощью 1 мл свежеприготовленной дневной культуры штамма-
- 15 хозяина. Титр фагов в элюате определяют, и элюат амплифицируют для получения как минимум 10^{10} фагов, которые инкубируют с новой порцией преинкубационного материала и новой порцией сосудистых гладкомышечных клеток, повторяя селекционный цикл 3-5 раз.

- При использовании многошаговой процедуры, 10^{10} фаговых частиц из любой библиотеки, растворяют в 2 мл буфера HBSS и инкубируют 20 минут с преинкубационным материалом (чашкой Петри, в которой вместо клеток содержалась лишь среда). После этого, верхнюю фазу, содержащую не связавшиеся с пластиком фаги, переносят на предварительно промытые эндотелиальные клетки и инкубируют в течение 40 минут при температуре 4°C , с последующим переносом
- 20 верхней фазы на новую порцию эндотелиальных клеток и аналогичной инкубацией, что повторяют 2-3 раза и лишь после этого, верхнюю фазу направляют на фибробласты и проводят сходную селекцию 2-3 раза. Или верхнюю фазу после инкубации на эндотелиальных клетках, без дополнительной селекции на фибробластах, переносят непосредственно на сосудистые гладкомышечные клетки и ин-
- 25 кубировать в течение 40 минут при температуре 4°C . Отмывку и элюцию проводят, как описано выше.
- 30

В другом случае, верхнюю фазу после инкубации с преинкубационным материалом (чашкой Петри, в которой вместо клеток содержалась лишь среда) переносят на предварительно промытые клетки HeLa и инкубируют с ними в течение 40 минут при температуре 4⁰С, а далее верхнюю фазу переносят на клетки Нер-G2 и инкубируют с ними в течение 40 минут при температуре 4⁰С, после чего верхнюю фазу переносят на новую порцию клеток HeLa и клеток Нер-G2, повторяя комбинированную селекцию 2-3 раза. Конечную верхнюю фазу переносят на сосудистые гладкомышечные клетки и инкубируют в течение 40 минут при температуре 4⁰С.

В следующем варианте скрининга, материал, после селекции на immortalized типах клеток, переносят на эндотелиальные клетки и/или фибробласты и лишь затем на сосудистые гладкомышечные клетки.

Пример 7. Выполнение комбинированного тестирования пептидов в составе бактериофаговых частиц.

А. Иммуноферментный анализ

Специфичность индивидуальных пептидов в составе фаговых частиц, оценивают, используя их, вместо первого антитела в прямом иммуноферментном анализе, где в качестве антигена выступают клетки определённых типов и клетки других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Для этого, клетки всех используемых типов культивируют в 96-луночных планшетах, иницируя культуру из расчёта 10000 клеток на лунку. Клетки растут в течение 48 часов, при этом, проводят замену питательной среды каждые 24 часа. Затем, планшеты промывают интенсивно 5 раз по 5 минут, используя каждый раз 200 мкл буфера HBSS. Далее инкубируют 10⁶-10⁷ фаговых частиц с клетками в течение 1 часа при температуре 4⁰С, с интенсивной последующей отмывкой буфером HBSS, и инкубацией со вторым антителом, в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве второго антитела используют моноклональное антитело конъюгированное с пероксидазой хрена и распознающее мотив из 11 аминокислот (N'-Met-Ala-Ser-Met-Thr-(Gly)₂-(Gln)₂-Met-Gly-C') (Novagen, Cat. No.69522), расположенный на N-конце белка №10, входящего в состав капсида бактериофага T7. Затем, планшеты промывают вновь буфером HBSS и производят обнаружение

второго антитела, используя субстрат для пероксидазы, расщепление которого останавливают добавлением 50 мкл 1М р-ра серной кислоты.

Б. Анализ на связывание

Связывание индивидуальных пептидов в составе фаговых частиц с клетками различных типов исследуют, используя одношаговую селекцию, при которой анализируемый пептид тестируют параллельно, на связывание с клетками распознаваемого типа и с клетками других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Для этого иницируют культуру клеток СГМК в чашках Петри диаметром 60 мм в расчёте 64000 клеток на чашку и культивируют в течение 48 часов. Одновременно, в аналогичных чашках иницируют культуры эндотелиальных клеток, фибробластов, HeLa, Herp-G2, соответственно в количествах - 48000, 24000, 16000, 16000 клеток на чашку, и растят в течение 48 часов. Используют 10^9 фаговых частиц несущие уникальный пептид, которые растворяют в 2 мл буфера HBSS. Такой раствор инкубируют сначала в течение 20 минут с преинкубационным материалом (чашкой Петри, в которой вместо клеток содержалась лишь среда) и потом переносят верхнюю фракцию на испытываемые клетки, предварительно промытые 5 раз буфером HBSS, длительностью по 5 минут каждый раз. При этом процедуру параллельно совершают, как для сосудистых гладкомышечных клеток (распознаваемый тип клеток), так и для эндотелиальных клеток, фибробластов, клеток HeLa и Herp-G2 (клетки, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию), используя для клеток всех типов 2 режима температур: 4°C и 37°C . После инкубации, не связавшиеся частицы, интенсивно отмывают, используя буфер HBSS, после чего элюируют используя 1 мл буфера для элюции. Определяют титр фагов в элюате и сравнивают полученные данные для всех типов клеток. При этом, чем больше отношение титра фагов, полученных после элюции с СГМК к титру фагов, полученных с других типов клеток, тем более специфичен пептид в составе фаговой частицы к СГМК, и соответственно, менее специфичен к другим типам клеток.

В. Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Специфичность индивидуальных пептидов в составе фаговых частиц тестируют, используя ПЦР для идентификации клонов, а также для анализа их количественного распределения при взаимодействии с клетками распознаваемого типа и клетками других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию.

Для этого, иницируют культуру клеток СГМК в чашках Петри диаметром 60 мм в расчёте 64000 клеток на чашку и культивируют в течение 48 часов. Одновременно, в аналогичных чашках иницируют культуры эндотелиальных клеток, фибробластов, HeLa, Herp-G2, соответственно в количествах - 48000, 24000, 16000, 16000 клеток на чашку, и культивируют в течение 48 часов. Фаговые частицы смешивают в эквивалентных количествах, обычно 10^7 частиц каждого типа, из расчета на конечный объём раствора 2 мл. Полученный раствор фаговых частиц инкубируют сначала в течение 20 минут с преинкубационным материалом (чашкой Петри, в которой вместо клеток содержалась лишь среда) и потом переносят верхнюю фракцию на испытуемые клетки, предварительно отмытые 5 раз буфером HBSS, длительностью по 5 минут каждый. При этом, процедуру одновременно совершают, как для сосудистых гладкомышечных клеток (распознаваемый тип клеток), так и для эндотелиальных клеток, фибробластов, клеток HeLa и Herp-G2 (клетки, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его течение, диагностику и терапию), используя для клеток всех типов 2 режима температур: 4°C и 37°C . После инкубации, не связанные частицы, интенсивно отмывают, используя буфер HBSS, после чего связанные фаги элюируют, используя 1 мл буфера для элюции. Затем, определяют титр фагов в элюате и рассеивают равные аликвоты элюата до получения единичных бляшек. Отбирают с каждой чашки 100 бляшек, распределяют их группами по две и выделяют ДНК посредством лизиса фаговых частиц. Для этого инкубируют фаговые частицы в 10 мМ растворе ЭДТА в течение 10 минут при температуре 65°C , с последующим охлаждением и центрифугированием в течение 3 минут на $14000 \times g$. Полученный раствор, содержащий ДНК бактериофага используют в качестве матрицы для ПЦР по стандартной для данного вектора схеме, направляемой праймерами к участкам вектора (T7 "Forward" праймер: 5' - AACCCCTCAAGACCCGTTTA - 3'; T7 "Reverse" праймер: 5' -

GGAGCTGTCGTATTCCAGTC - 3') , или специально разработанными праймерами. После этого, определяют абсолютную частоту встречаемости каждого из пептидов в составе фаговых частиц в зависимости от типа клеток.

Г. Тест на стабильность пептида и способность интернализироваться в составе фаговой частицы.

Стабильность индивидуального пептида в составе фаговой частицы, т.е. способность максимально долго сохранять свою функциональную эффективность в клетке, которую он специфически распознаёт и в самом организме хозяина, напрямую пересекается со способностью эффективно проникать в клетку, сохранять активность и специфически бомбардировать внутриклеточные мишени.

Для этого, иницируют культуру клеток СГМК в чашках Петри диаметром 60 мм в расчёте 64000 клеток на чашку и культивируют в течение 48 часов. Одновременно, в аналогичных чашках, иницируют культуры эндотелиальных клеток, фибробластов, HeLa, Нер-G2, соответственно в количествах - 48000, 24000, 16000, 16000 клеток на чашку, и культивируют в течение 48 часов. 10^{10} фаговых частиц несущих пептиды, распознающие клетки определённого типа в своём составе и представляющих фракцию, полученную после элюции фагов в результате 3-х раундов селекции многошаговым скринингом, инкубируют с сосудистыми гладкомышечными клетками при 2-х режимах температур: 4°C и 37°C и в течение различных периодов времени. Далее, клетки отмывают и лизируют в течение 10 минут, используя 2 мл буфера для лизиса (1 мл 2%-го р-ра дезоксихолевой к-ты; 10 мМ Трис; 2 мМ ЭДТА, pH 8,0). После нейтрализации, раствор, содержащий фаги рассеивают до одиночных бляшек, которые затем отбирают с целью определения первичной последовательности олигонуклеотидных фрагментов, кодирующих пептиды в составе отобранных фаговых частиц, а также для проведения дополнительного тестирования.

Пример 8. Определение первичной последовательности олигонуклеотидных фрагментов и кодируемых ими аминокислотных последовательностей пептидов, с последующим компьютерным анализом.

Олигонуклеотидные фрагменты ДНК участка генома вектора, представляющие вставки кДНК и кодирующие специфичные пептиды, и ограниченные праймерами вектора, амплифицируют используя ПЦР, и определяют их первич-

ную последовательность, методом дидезокси-секвенирования по Сэнгеру используя автоматический секвенатор, например, ABI Prism 310 (Applied Biosystems Inc.) руководствуясь рекомендованные производителем протоколами проведения реакций.

5 Используя сигналы распознавания в векторе, первичную последовательность олигонуклеотидных фрагментов вставок транслируют в рамке считывания в аминокислотные последовательности пептидов специфично связывающихся с активно пролиферирующими и арестованными в росте формами гладкомышечных клеток, и полученные в результате аминокислотные последовательности перерас-
10 пределяют согласно, их длине и происхождению. В первую группу помещают пептиды с короткой аминокислотной цепью (до 30 звеньев) которые распознают исключительно линейные эпитопы (участки) рецепторных белков расположенных на поверхности гладкомышечных клеток. Во вторую группу при этом отбираются пептиды с длинной аминокислотной цепью и фрагментами белков, которые свя-
15 зываются с гладкомышечными клетками, распознавая сложные вторичные и третичные структуры на их поверхности. Аминокислотные последовательности в каждой из двух групп далее последовательно анализируют согласно следующему алгоритму: 1) ищут гомологию с известными аминокислотными последовательностями, зарегистрированными в международных молекулярно-биологических
20 базах данных, используя алгоритмы совмещения, предоставляемые через сервера BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) и ExPaSy (www.expasy.org/tools/#align); 2) определяют первичную структуру и физико-химические характеристики пептидов, используя при этом алгоритмы NHH предоставляемые через сервер ExPaSy (<http://www.expasy.org/tools/>) в комбинации с автономными пакетами, находящимися в свободном доступе. При этом определяют такие параметры как частота встречаемости различных классов аминокислот (структурообразующих, гидрофобных, заряженных позитивно, заряженных негативно, полярных без заряда) в каждой из позиций полипептида, начиная с N- конца молекулы. Дополнительно, определяют профиль гидрофобности, а также средний заряд и среднюю гидро-
25 фобность в пересчёте на звено цепи для всей молекулы пептида; 3) определяют элементы вторичной и третичной структуры пептидов, сравнивая последовательности из базы данных по белковым молекулам (<http://www.wwpdb.org/>) с после-

довательностями специфических пептидов, например, используя пакет программ WebLab ViewerPro v4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, U.S.A.).

Возможные участки связывания специфических пептидов с молекулами белков на поверхностях гладкомышечных клеток выявляют, посредством сравнения совмещений фрагментов пептидов в многомерном пространстве, используя данные полученных для первой и второй групп аминокислотных последовательностей одновременно.

Пример 9. Проектирование матриц из аминокислотных последовательностей, создание пептидного конструкта и считывание новых пептидов (см. фиг.3).

Конструирование матриц осуществляется за счёт унификации полипептидных цепей, предполагающее использование наименьшего количества аминокислотных звеньев для получения пептидов с минимальной комплексностью (для уменьшения времени и затрат на синтез пептидов) и максимальной специфичностью связывания клетками избранного типа (для уменьшения количеств пептидов при использовании в диагностических и терапевтических приложениях).

Конструируют матрицы из аминокислотных последовательностей в 2 этапа. На первом этапе создают набор коротких матриц (не более 5 аминокислот) посредством перекрытия коротких участков встречающихся с наибольшей частотой в анализируемых аминокислотных последовательностях, используя, например, пакет программ Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). На втором этапе, короткие матрицы комбинируют в группы по 3 и более с участками перекрытия на С- и N- концах пептидов не более 2-х аминокислот. После этого, формируют полноразмерный пептидный конструкт, добавляя к С- концу матрицы полученной на втором этапе, последовательности линкера и сигнала обнаружения.

Полученные пептидные конструкты используют для считывания специфичных пептидов, таким способом, чтобы, как минимум один из считанных пептидов, содержал оригинальную последовательность пептида отобранного на этапе селекции, а остальные представляли собой максимально различающиеся комбинации аминокислотных звеньев. Считывание новых специфичных пептидов производят блоками, включающими как минимум 2 триплета (6 пептидов).

Пример 10. Химический синтез новых пептидов.

Синтез пептидов, специфически распознающих определенный тип клеток, осуществляют на твёрдофазном носителе с участием аппарата для автоматизации химического синтеза пептидов, например PE Biosystems Pioneer® (Foster City, CA, U.S.A.), используя термостатичную колонку, наполненную 2-хлоротритил хлоридным носителем (замещение 0,27 ммоль/г носителя глицином), поддерживая постоянную температуру 50 °С. Присоединение первой аминокислоты с С-конца пептида осуществляют согласно технической документации аппарата для автоматизации химического синтеза. Присоединение каждой последующей аминокислоты производят, используя четырёхкратный избыток смеси флуорил-9-илметоксикарбонил аминокислоты, ТБТУ (О-(Бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий тетрафлуороборат) и диизопропилэтиламин (в соотношении 1:1:1,7, по объему) в растворе, предотвращающем агрегацию (диметилформамид / N-метилпирролидон (3:1, по объему), 1% Тритон X-100 и 1М этиленкарбонат). Цикл присоединения активированных аминокислот повторяют дважды на тех участках пептидной молекулы, для которых синтез является сложным из-за комплексной вторичной структуры цепи, что предварительно выявляют с помощью пакета программ, например, Peptide Companion (CoshiSoft, AZ, U.S.A.).

Процесс синтеза периодически останавливают и отбирают пробу для оценки качества реакции с помощью масс-спектрометрии с ионизирующим распылением, например (ESI)-MS, (Perkin Elmer/Sciex API I, PE Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). Полученные пептиды отщепляют от носителя и деактивируют, используя смесь из трифторуксусной кислоты, воды, тиоанизола, фенола, этандиола и 3-изопропилсилана (в соотношении 82,5:5:5:2,5:2,5:2,5, по объему). Неочищенные пептиды восстанавливают в течение 60 минут, при температуре 60 °С в 10 кратном избытке раствора трис-(2-карбоксиэтил) - фосфин гидрохлорида, приготовленном в буферном растворе, содержащем 6М гунидинхлорида и 0,1М цитрата натрия (pH 3,0).

Затем пептиды немедленно опресняют посредством жидкостной хроматографии на C₁₈ колонке, например, Waters Delta-Pak® C₁₈ (15 мкм, 300 Å, 25 мм×100 мм) в растворителях насыщенных молекулярным азотом, а сопутствующее окисление пептидных молекул, контролируют.

Концентрацию пептидов после очистки, предварительно оценивают по поглощению молекул триптофана и тирозина на длине волны 280 нм, а точные значения вычисляют с помощью теста на окисление протеинов бихинольными соединениями.

5 Пример 11. Подтверждение специфичности новых пептидов.

Подтверждение специфичного распознавания гладкомышечных клеток новыми синтезированными пептидами проводят, например, методом иммуноферментного анализа, описанным в примере 7, используя вместо первого антитела не фаговую частицу, а полученный пептид.

10 При этом 40 мкг пептида инкубируют с клетками в течение 40 минут при температуре 37 °С, после чего клетки фиксируют, помещая их в 100%-ный раствор метилового спирта на 10 минут при температуре -20 °С. Затем клетки промывают буфером HBSS, содержащим 0,1 % сапонины и 1,0 % сухого молока (по массе), и инкубируют в течение 10 минут с раствором второго антитела.

15 Специфичность распознавания гладкомышечных клеток новыми пептидами выражают в относительных единицах и сравнивают её со специфичностью любых фаговых частиц, выбранных случайным образом из множества библиотек, описанных в примере 4, до проведения селекции.

20 Таким образом, при выполнении заявленного способа получения пептидов специфично распознающих клетки определённого типа, получили ряд пептидов специфичных в отношении гладкомышечных клеток:

1. N'-Asn-Ser-Trp-Pro-Leu-Ser-Arg-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Leu-His-Pro-Ser-Leu-Leu-C'

2. N'-His-Ala-Tyr-Lys-Ala-Pro-His-Ser-Pro-Ala-Ile-Pro-Leu-His-Pro-Arg-Pro-Gly-C'

25 3. N'-(Arg)₂-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg-Pro-Arg-(Leu)₂-(Pro)₂-Arg-Pro-Arg-(Pro)₂-C'

4. N'-His-Ser-Trp-Lys-Leu-Pro-His-Pro-Arg-(Leu)₂-Ser-Pro-His-Pro-(Ser)₂-Pro-Gly-C'

5. N'-Asn-Ser-Tyr-His-Ile-Ser-His-Ser-Arg-Ala-Val-Tyr-Pro-His-Arg-(Leu)₂-C'

Формула изобретения

Способ получения пептидов, специфично распознающих клетки определённых типов и предназначенных для терапевтических целей, при котором, предусматривают конструирование фаговой библиотеки случайных пептидов на основе кодирующих их олигонуклеотидных фрагментов, её скрининг для получения пептидов, связывающихся с клетками определённого типа и подтверждают специфичность отобранных пептидов, отличающийся тем, что:

- олигонуклеотидные фрагменты, кодирующие случайные пептиды, получают реакцией обратной транскрипции с использованием случайных праймеров и суммарных РНК клеток определённого типа и клеток других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его диагностику и терапию,

- указанные олигонуклеотидные фрагменты встраивают в бактериофаговые векторы в правильной ориентации и используют для создания фаговых библиотек случайных пептидов для всех типов клеток, использованных для выделения суммарных РНК,

- скрининг полученных фаговых библиотек случайных пептидов проводят в два этапа, на первом из которых отбирают пептиды, способные связываться с клетками определённого типа, а на втором – из отобранных на первом этапе пептидов отбирают пептиды, не связывающиеся с клетками других использованных типов,

- подтверждают специфичность пептидов в составе фаговых частиц к клеткам определённого типа, используя комбинации различных тестов,

- определяют первичные последовательности олигонуклеотидных фрагментов кодирующих пептиды в составе отобранных фаговых частиц, и транскрибируют их в аминокислотные последовательности с дальнейшим проведением анализа полученных последовательностей,

- конструируют матрицы из аминокислотных последовательностей пептидов, на основе их физико-химических характеристик, включающие линкер и сигнал обнаружения,

- считывают последовательности новых пептидов с матриц и синтезируют такие пептиды химическим путём, с последующим подтверждением специфичности полученных пептидов к клеткам определённого типа.

[получена Международным бюро 12 января 2010 (12.01.2010)]

1. Способ получения пептидов, специфично распознающих клетки определённых типов и предназначенных для терапевтических целей, при котором, предусматривают конструирование фаговой библиотеки случайных пептидов на основе кодирующих их олигонуклеотидных фрагментов, её скрининг для получения пептидов, связывающихся с клетками определённого типа и подтверждают специфичность отобранных пептидов, отличающийся тем, что:

- олигонуклеотидные фрагменты, кодирующие случайные пептиды, получают реакцией обратной транскрипции с использованием случайных праймеров и суммарных РНК клеток определённого типа и клеток других типов, которые могут быть вовлечены в патологический процесс или способны оказывать влияние на его диагностику и терапию,

- указанные олигонуклеотидные фрагменты встраивают в бактериофаговые векторы в правильной ориентации и используют для создания фаговых библиотек случайных пептидов для всех типов клеток, использованных для выделения суммарных РНК,

- скрининг полученных фаговых библиотек случайных пептидов проводят в два этапа, на первом из которых отбирают пептиды, способные связываться с клетками определённого типа, а на втором – из отобранных на первом этапе пептидов отбирают пептиды, не связывающиеся с клетками других использованных типов,

- подтверждают специфичность пептидов в составе фаговых частиц к клеткам определённого типа, используя комбинации различных тестов,

- определяют первичные последовательности олигонуклеотидных фрагментов кодирующих пептиды в составе отобранных фаговых частиц, и транслируют их в аминокислотные последовательности с дальнейшим проведением анализа полученных последовательностей,

- конструируют матрицы, из аминокислотных последовательностей пептидов, селективно выбранных и распознающих клетки определённого типа, на основе их физико-химических характеристик, к которым присоединяют с

помощью линкера сигнал обнаружения, при этом сигнал обнаружения используют как для одного вида, так и различных видов новых пептидов, после считывания их с матриц,

- 5 - считывают последовательности новых пептидов с матриц и синтезируют такие пептиды известным способом синтеза на твердофазном носителе, причём используют объемно-весовые значения носителя в интервале от 0,1 до 0,7 ммоль/г, в режиме температур от 30 °С до 75 °С, и растворы, предотвращающие агрегацию, содержащие не менее одной объемной части N-метилпирролидона, с последующим подтверждением специфичности полученных пептидов к клеткам
- 10 определённого типа.

2. Способ получения пептидов, по п.1., отличающийся тем, что в качестве сигнала обнаружения и линкера используют биоорганические соединения.

ОБЪЯСНЕНИЕ В СООТВЕТСТВИИ СО СТАТЬЕЙ 19 (1)

В выводе международного поискового органа, указано, что заявленное техническое решение не соответствует критерию «изобретательский уровень», или неочевидности, на основании известного решения по патенту RU 2330886 С2 и Dawson P.E. et al.

Изобретение RU 2330886 С2 относится к структурам нуклеиновых кислот, и способам их применения, кодирующим бесцветный белок *A. coeruleus*, его флуоресцирующий и нефлуоресцирующий мутанты, а также к белкам и пептидам, кодируемым данными нуклеиновыми кислотами, включая слитые белки, причём специфичность определяется оптическим свойством - способностью к флуоресценции и/или фотоактивации. Следовательно, это изобретение может быть использовано только для мечения. При этом, белки согласно данному изобретению могут быть использованы в качестве маркеров, слитых с пептидами (такими как направляющие к мишени последовательности) или белками, использующимися в сигнальной трансдукции. Из этого не следует, что полученные слитые полипептиды являются специфичными относительно тех или иных избранных клеток - мишеней, то есть, нет селективного отбора данных полипептидов, и таким образом, в данном известном решении не описан способ получения пептидов специфично распознающих определённые типы клеток.

Кроме того, слитые полипептиды конструируют прямым слиянием нативного, или мутантного, полипептида acGFP и второго полипептида («партнер слияния»), в рамке считывания с N-концом и/или С-концом полипептида acGFP, без использования линкеров. При этом полученные слитые полипептиды обладают только свойством флуоресценции, необходимым для мечения.

Кроме того, патент RU 2330886 С2 является выданным на национальной фазе по международной заявке по процедуре PCT WO 03/062270 (31.07.2003), на основании которой уже выданы Европатент EP1485481 и патент США US 7,432,053 В2. В формулах изобретений вышеупомянутых патентов отсутствуют притязания на конструкцию флуоресцентного полипептида и партнёра слияния, **который представляет собой направляющий к мишени пептид или сигнальный пептид**, который присутствует в формуле изобретения по патенту RU 2330886 С2 в п.6 и не подтверждены описанием данного патента, и тем самым, выходят за рамки заявленных притязаний, что противоречит ст.6 и ст.41, п.2 Договора о Патентной Кооперации (РСТ).

Заявителем ставится задача создания способа получения универсальных пептидов, специфично распознающих определённые типы клеток, с целью, например, доставки лекарственных препаратов к ним, а задачей изобретения по патенту RU 2330886 С2 является получение новых флуоресцирующих белков *A. coeruleus* и

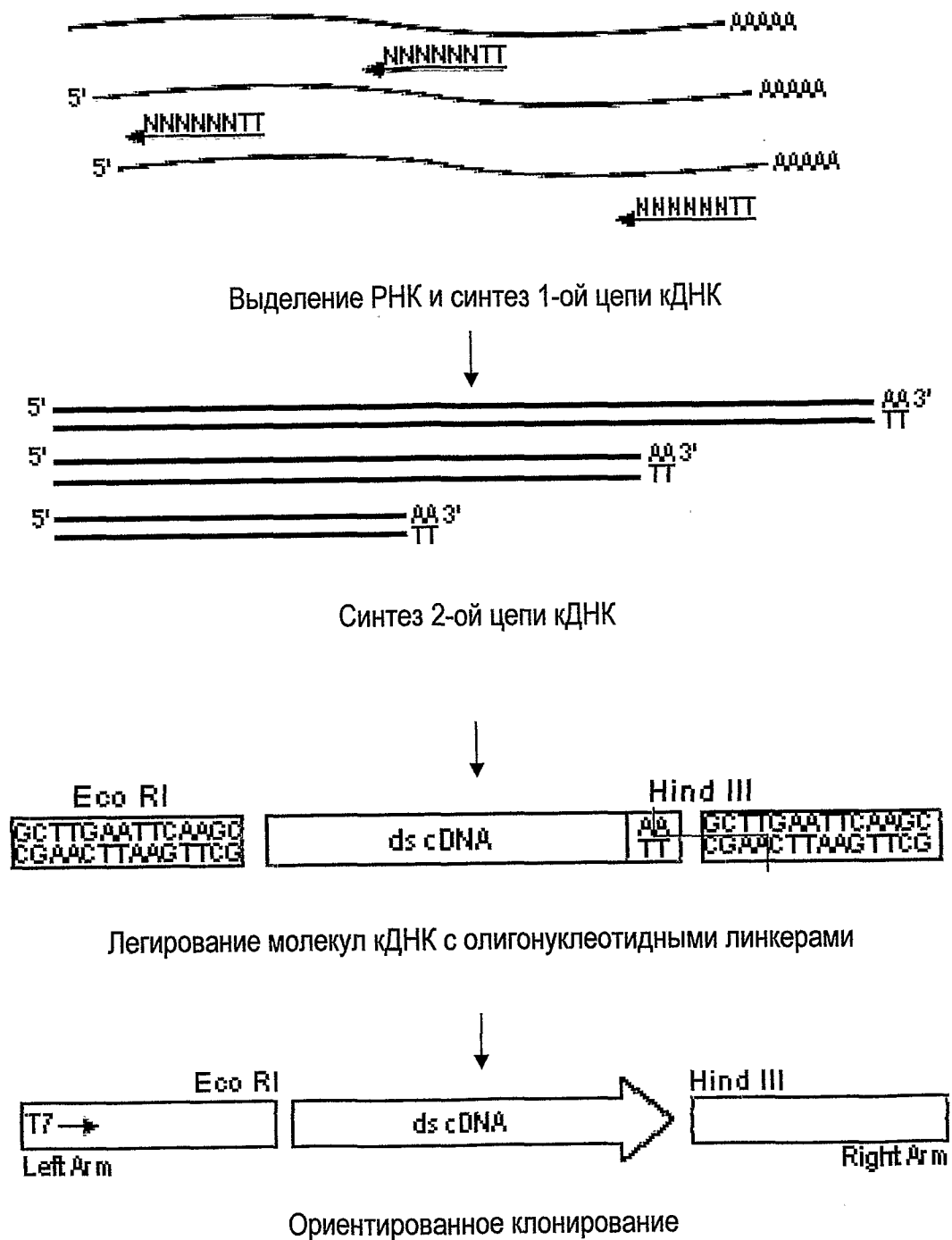
способы их применения для мечения. Кроме того в заявленном способе получения пептидов применяют в качестве линкеров и сигналов обнаружения любые биоорганические соединения, при этом при различном использовании биоорганических соединений сигнал обнаружения могут использовать как для одного вида, так и различных видов новых пептидов, после считывания их с матриц.

Заявитель использует модификации известного способа синтеза пептидов, на твердофазном носителе описанного в Dawson P.E. et al., при котором используют определенные для заявленного способа объемно-весовые значения носителя, температурный режим и растворы, предотвращающие агрегацию. И тем самым сужает свои притязания по использованию химического синтеза в способе получения пептидов специфично распознающих определённые типы клеток и предназначенных для терапевтических целей.

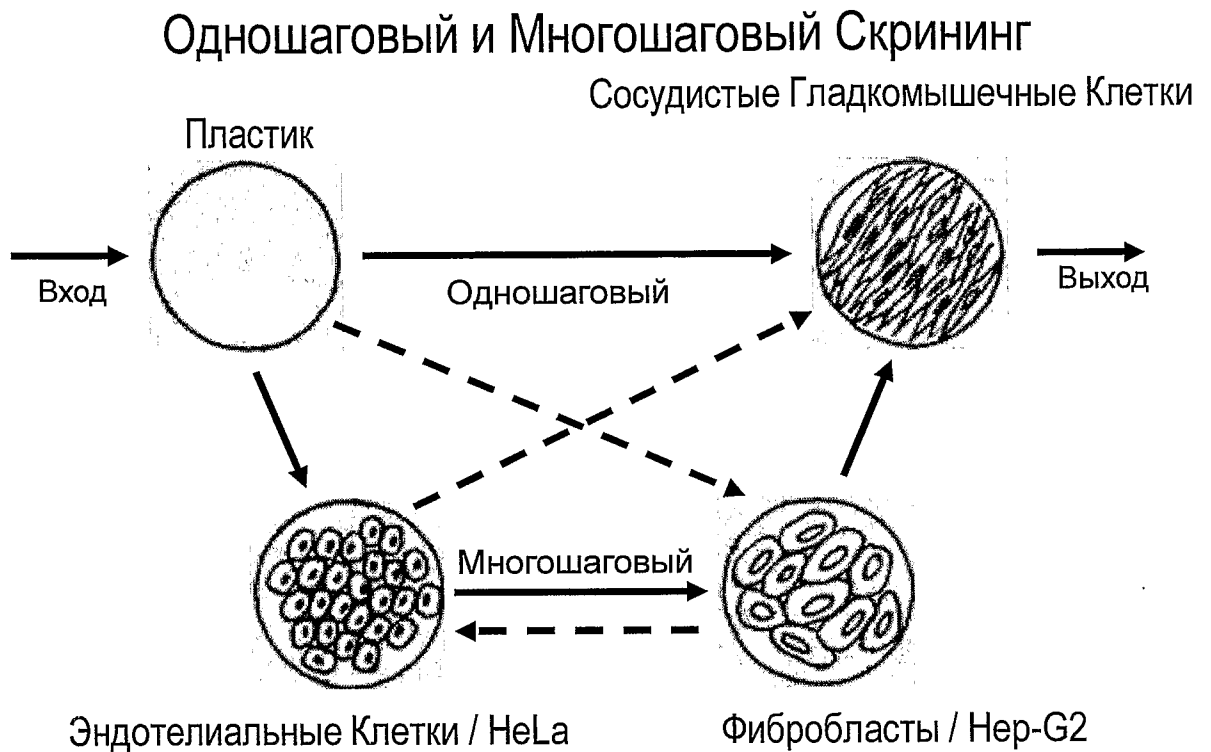
Заявитель констатирует, что заявленный способ получения пептидов, специфично распознающих определённые типы клеток, характеризуется и может достигнуть конечного технического результата только полным выполнением приёмов, действий и использованием необходимых материалов указанных в формуле изобретения.

Изменения в формуле изобретения п.1 и добавление п.2 не влекут изменения международной заявки в первоначально поданные описание, чертежи и реферат.

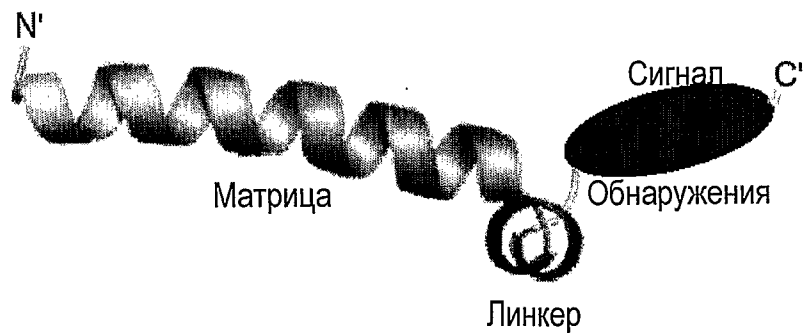
1/2



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/UA 2009/000011

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/12 (2006.01); C07K 14/47 (2006.01); C12N 7/01 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 7/01

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, ROSPATENT, Patents (PCT), DEPATISnet, K-PION, Pat FT, Esp@senet, SNAPT, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UA 66110 A (RAZUMENKO MIKHAILO VIKTOROVICH) 15.04.2004, the claims, example 7, 8	1
Y	RU 2330886 C2 (ZAKRYTOE AKTSIONERNOE OBSHESTVO "EVROGEN AIPI") 10.08.2008, the claims p.6	1
Y	DAWSON PE et al., "Synthesis of native proteins by chemical ligation", Annu Rev Biochem. 2000; 69: 923-60, the abstract, [found 20.11.2009]. Found from PubMed. PMID: 10966479	1
A	MICHON Ingrid N. et al., "Targeting of peptides to restenotic vascular smooth muscle cells using phage display in vitro and in vivo", Biochimica et Biophysica Acta 1591 (2002), 87-97	1
A	RU 2263146 C2 (RAZUMENKO MIKHAIL VIKTOROVICH) 27.10.2005	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

17 November 2009 (17.11.2009)

Date of mailing of the international search report

03 December 2009 (03.12.2009)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/UA 2009/000011

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: <i>C12N 15/12 (2006.01)</i> <i>C07K 14/47 (2006.01)</i> <i>C12N 7/01 (2006.01)</i>		
Согласно Международной патентной классификации МПК		
В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:		
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации): C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 7/01		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): PubMed, ROSPATENT, Patents (PCT), DEPATISnet, K-PION, Pat FT, Esp@cenet, SNAPT, PAJ		
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	UA 66110 A (РАЗУМЕНКО МИХАЙЛО ВИКТОРОВИЧ) 15.04.2004, формула, пример 7, 8	1
Y	RU 2330886 C2 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ЕВРОГЕН АЙПИ") 10.08.2008, формула п.6	1
Y	DAWSON PE et al., "Synthesis of native proteins by chemical ligation", Annu Rev Biochem. 2000; 69: 923-60, реферат, [найдено 20.11.2009]. Найдено из PubMed. PMID: 10966479	1
A	MICHON Ingrid N. et al., "Targeting of peptides to restenotic vascular smooth muscle cells using phage display in vitro and in vivo", Biochimica et Biophysica Acta 1591 (2002), 87-97	1
A	RU 2263146 C2 (РАЗУМЕНКО МИХАИЛ ВИКТОРОВИЧ) 27.10.2005	1
☐ последующие документы указаны в продолжении графы С. ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* Особые категории ссылок документов: А документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным Е более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылоного документа, а также в других целях (как указано) О документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета Т более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста & документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска: 17 ноября 2009 (17.11.2009)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 03 декабря 2009 (03.12.2009)
Наименование и адрес ISA/RU ФГУ ФИПС, РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: (499) 243-3337		Уполномоченное лицо: М. Худяев Телефон № (495) 730-76-75