



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003109439/13, 04.09.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.09.2001(30) Конвенционный приоритет:
04.09.2000 (пп.1, 2, 4-7) KR 2000/0052055
04.09.2001 (п.3) KR 2001/0054005

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2004

(45) Опубликовано: 27.12.2007 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: MD 970100 A, 30.04.1998. KWAK, J.W.,
«Cloning and characterization of cDNAs coding
for heavy and light chains of a monoclonal
antibody (MabB23) specific for human plasma
apolipoprotein B-100», Gene, 1996 Mar 9;
169(2), реф. SU 1296019 A3, 22.04.1983.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
04.04.2003(86) Заявка РСТ:
KR 01/01492 (04.09.2001)(87) Публикация РСТ:
WO 02/20040 (14.03.2002)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

КИМ Хио-Дзоон (KR),
ДЗОУНГ Хае-Дзунг (KR)(73) Патентообладатель(и):
КИМ Хио-Дзоон (KR)(54) КОНКАТЕМЕР ПЕПТИДА, ИНДУЦИРУЮЩЕГО ВЫРАБОТКУ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
АПОЛИПОПРОТЕИНА В-100, ВАКЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
КОНКАТЕМЕРА, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ВЕКТОР

(57) Реферат:

Изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. Предложен конкатемер пептида, индуцирующий выработку антител против апополипротеина В-100, которые ингибируют действие липазы и препятствуют связыванию LDL с рецептором LDL. Указанный конкатемер состоит из аминокислотной последовательности пептида, повторяющейся четыре раза. Аминокислотная

последовательность приведена в описании. Описана вакцина для лечения и профилактики ожирения на основе конкатемера и способ получения конкатемера в E.coli с использованием вектора. Раскрыт полинуклеотид, кодирующий конкатемер и экспрессирующий вектор, содержащий указанный полинуклеотид. Использование изобретения позволяет подавлять ожирение. 5 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 табл., 12 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

- (51) Int. Cl.
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003109439/13, 04.09.2001**
 (24) Effective date for property rights: **04.09.2001**
 (30) Priority:
04.09.2000 (cl.1, 2, 4-7) KR 2000/0052055
04.09.2001 (п.3) KR 2001/0054005
 (43) Application published: **20.07.2004**
 (45) Date of publication: **27.12.2007 Bull. 36**
 (85) Commencement of national phase: **04.04.2003**
 (86) PCT application:
KR 01/01492 (04.09.2001)
 (87) PCT publication:
WO 02/20040 (14.03.2002)
 Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517

(72) Inventor(s):
KIM Khio-Dzoon (KR),
DZOUNG Khae-Dzung (KR)
 (73) Proprietor(s):
KIM Khio-Dzoon (KR)

(54) **PEPTIDE CONCATEMER INDUCING PRODUCTION OF ANTIBODY AGAINST APOLIPOPROTEIN B-100, VACCINE FOR OBESITY TREATMENT, METHOD FOR PREPARING CONCATEMER, POLYNUCLEOTIDE, EXPRESSING VECTOR**

(57) Abstract:
 FIELD: biotechnology, immunology, biochemistry, medicine.
 SUBSTANCE: invention proposes peptide concatemer inducing production of antibodies against apolipoprotein B-100 that inhibit lipase effect and inhibit binding LDL with LDL receptors. This concatemer consists of amino acid sequence of peptide repeating four times. Amino acid sequence is given in the invention description. Also, invention describes a

concatemer-base vaccine used in treatment and prophylaxis of obesity and a method for preparing concatemer in E. coli cells using a vector. Invention discloses a polynucleotide encoding concatemer and expressing vector comprising the indicated polynucleotide. Using the invention provides inhibition of obesity.
 EFFECT: valuable medicinal properties of concatemer and vaccine.
 7 cl, 16 dwg, 1 tbl, 6 ex

RU 2 313 536 C2

RU 2 313 536 C2

Область техники

Настоящее изобретение относится к вакцине для лечения ожирения. Конкретнее, настоящее изобретение относится к вакцине, которая включает миметический пептидный эпитоп аполипопротеина В-100, его конкатемеры или модифицированные пептиды.

5 Предпосылки изобретения

Липиды сыворотки крови включают холестерин, триглицериды (TG), свободные жирные кислоты, фосфолипиды и тому подобное, и находятся в кровяном русле в форме липопротеина, который представляет комплекс липида и аполипопротеина.

10 Из этих липопротеинов липопротеин низкой плотности (LDL) является основным носителем TG и холестерина. Значительно возросло число пациентов, страдающих атеросклерозом, заболеванием коронарных артерий или инфарктом миокарда, вызванных повышенным содержанием LDL-холестерина в крови, за счет изменения рациона или других факторов.

15 Следовательно, предпринимались различные исследования для снижения уровня LDL-холестерина и установления причины вышеуказанных заболеваний для лечения пациентов, страдающих вышеуказанными заболеваниями.

LDL-холестерин, основной этиологический фактор при заболеваниях у взрослых, связанных с метаболизмом липидов, может превращаться под действием макрофагов в липопротеин высокой плотности (HDL). Кроме того, LDL-холестерин может также 20 превратиться в другое вещество или превратиться в желчную кислоту в печени (Brown M.S. and Goldstein J.L., 1983, Annu. Rev. Biochem., 52:223-261).

Аполипопротеин В-100 представляет основную белковую часть LDL и находится также в липопротеине очень низкой плотности (VLDL) и хиломикроне. LDL-холестерин в крови можно удалить посредством фагоцитоза с участием макрофагов в случае, когда 25 стимулируется образование антител, распознающих аполипопротеин В-100, поскольку аполипопротеин В-100 приводит к тому, что частицы LDL связываются с LDL-рецепторами, расположенными на поверхности клеток (Dalum I. et al., 1997, Mol. Immunol., 34(16-17): 1113-20).

В случае, когда макромолекула такая, как антитело, связывается с аполипопротеином В-100, который находится на поверхности LDL, липаза такая, как липопротеинлипаза, не 30 может гидролизовать TG и тому подобное, за счет стерического несоответствия, вызванного тем, что макромолекула связана с аполипопротеином В-100. Следовательно, образование свободных жирных кислот, основного фактора для возникновения ожирения, можно ингибировать с помощью антител, которые могут связываться с аполипопротеином 35 В-100.

Недавно было предпринято несколько исследований с целью снижения уровня LDL-холестерина и подавления возникновения атеросклероза с использованием вакцины на различных моделях на животных, таких как мышь или кролик. Например, С.Р.Алвинг сообщил, что холестерин можно модифицировать метаболитами или его окислением и что 40 модифицированный холестерин в некоторых случаях может быть сильным антигенным детерминантом (Alving C.R. et al., 1989, Biochem. Soc. Trans., 17(4): 637-9; Alving C.R. et al., 1996, J. Lab. Clin. Med., 127: 40-49; Alving C.R. et al., 1996, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 210: 181-6).

Кроме того, сообщалось, что в сыворотке крови имеются эндогенные антитела к 45 холестерину (Wu J.T., L.L., 1997, Clin. Lab. Med., 17(3): 595-604, Review). Также сообщалось, что в опыте, в котором у кроликов индуцировался атеросклероз и гиперхолестеринемия при скармливании содержащего холестерин корма, проявление гиперхолестеринемии и атеросклероза у кроликов, иммунизированных введением содержащих холестерин липосом, подавлялось или заметно снижалось по сравнению с 50 контрольной группой.

Таким антителом, индуцированным вакциной к холестерину, является иммуноглобулин М (IgM), который связывается с VLDL, липопротеином промежуточной плотности (IDL) и LDL. Основываясь на вышесказанном, полагается, что возможно создание вакцины для

лечения или профилактики гиперлипидемии или атеросклероза, вызванных высоким уровнем холестерина (Bailey J.M., 1994, Science, 264: 1067-1068; Palinski W. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92(3): 821-5; Wu R. et al., 1999, Hypertension, 33(1): 53-9).

Заявители установили, что ожирение можно эффективно предотвратить миметическим пептидным эпитопом аполипопротеина В-100, и, основываясь на вышесказанном, разработали вакцину для лечения ожирения.

Раскрытие изобретения

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение миметического пептида для эпитопа аполипопротеина В-100, его конкатемера и модифицированных пептидов.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения вышеуказанного миметического пептида для эпитопа аполипопротеина В-100, его конкатемера и модифицированных пептидов.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение вакцины для лечения или профилактики ожирения, которая включает вышеуказанный миметический пептид для эпитопа аполипопротеина В-100, его конкатемер и модифицированные пептиды.

Цель настоящего изобретения достигается обеспечением миметического пептида для эпитопа аполипопротеина В-100, его конкатемера и модифицированных пептидов.

В настоящем изобретении использовалась библиотека пептидов фага для скрининга эпитопа человеческого аполипопротеина В-100, связанного с моноклональными антителами (MabB23). Подвергнутые скринингу вышеуказанные пептиды представляли миметические пептиды, в структурном отношении близкие к антигенной детерминанте, которая может распознаваться антителами, и данные миметические пептиды были синтезированы согласно аминокислотной последовательности подвергнутых скринингу пептидов.

Библиотека пептидов представляет способ поиска трехмерной формы антигенной детерминанты. То есть, фрагменты ДНК, которые кодируют произвольно секвенированные пептиды, вставляют в ДНК, которая кодирует минорный белок оболочки фага, и затем вставляют в RF (рамку считывания) ДНК и трансформируют в E.coli для их экспрессии. Экспрессированные на поверхности E.coli пептиды подвергают взаимодействию с антигеном для того, чтобы отобрать пептиды, структурно близкие к антигенной детерминанте.

Для того, чтобы получить антисыворотку, мышей иммунизируют введением вышеуказанных миметических пептидов. Было доказано, что полученная таким образом антисыворотка распознает первоначальный аполипопротеин В-100 и одновременно миметические пептиды и LDL (Identification of Antigenic Determinants for the Murine Monoclonal Antibodies Against Apolipoprotein A-1 and Apolipoprotein B-100 by using Phage-displayed Random Peptide library, Chi-Hoon Kim, Hanyang Univ., 1997).

Миметический пептид для эпитопа аполипопротеина В-100 по настоящему изобретению можно выбрать из пептидов с последовательностями SEQ.ID. № 1, SEQ.ID. № 2, SEQ.ID. № 3 или их комбинаций.

Миметические пептиды по настоящему изобретению можно использовать в форме конкатемера для того, чтобы улучшить их антигенную детерминанту. В качестве осуществления настоящего изобретения можно связать два или более миметических пептида друг с другом. Желателен конкатемер, состоящий из трех (3) - пятнадцати (15) пептидов. Более предпочтительно конкатемер по настоящему изобретению включает четыре (4) пептида с последовательностью SEQ.ID. № 1.

«Конкатемер» вышеуказанного миметического пептида по настоящему изобретению относится к полимеру, в котором концы вышеуказанных миметических пептидов связаны друг с другом.

«Модифицированный пептид» вышеуказанного миметического пептида по настоящему изобретению относится к вариантам миметических пептидов, которые могут распознаваться моноклональными или поликлональными антителами к аполипопротеину

В-100. Такие варианты включают замены, делеции, добавления и химические замены одной или более аминокислот в миметическом пептиде по настоящему изобретению.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения миметического пептида, его конкатемера и модифицированных пептидов, который

5 включает: i) стадию вставки ДНК, которая кодирует вышеуказанный миметический пептид, его конкатемер или модифицированный пептид, в вектор; ii) стадию трансформации вышеуказанного вектора в клетки-хозяева и затем их инкубацию и iii) стадию выделения вышеуказанного миметического пептида, его конкатемера или модифицированных пептидов из клеток-хозяев.

10 Приготовление вакцины можно проводить любым общепринятым способом с миметическим пептидом, его конкатемером или модифицированными пептидами по настоящему изобретению. Предпочтительно, чтобы в способе получения вышеуказанного препарата композиция, в которой активное соединение смешано или разбавлено

15 иммунным адъювантом, препаратом для усиления иммунитета, носителем, наполнителем или разбавителем, была выбрана из группы, состоящей из таблетки, пилюли, гранулы, порошка, облатки, суспензии, эмульсии, жидкости, сиропа, аэрозоля, мягкой или твердой желатиновой капсулы, стерильного раствора для инъекций, стерильного порошка и тому подобное.

Иммунный адъювант, который можно использовать в композиции по настоящему

20 изобретению, представляет вид белков, содержащих эпитоп Т-клеток (например, поверхностный белок вируса гепатита В), инертный носитель, такой как соль алюминия, бентонит, латекс, акриловую частицу и тому подобное; гидрофобный антиген (например, липид), эмульсии вода-масло и масло-вода, образователь депо (например, полисахарид), активатор Т-клеток, такой как PPD, полиаденин, полиурацил и тому подобное; активатор

25 В-клеток (например, В-клеточный митоген), поверхностно-активное вещество, такое как сапонин, лизолецитин, ретинал, квил А (quil A), липосому и тому подобное; вещество для усиления активности макрофагов и активаторы альтернативного пути комплемента, такие как инулин, зимозан, эндотозин, лебамизол, С. parvum и тому подобное.

«Белок-носитель» по настоящему изобретению означает фармацевтически приемлемое

30 вещество, такое как белок или соль алюминия, которые могут транспортировать миметический пептид, его конкатемер и модифицированные пептиды по настоящему изобретению, по кровяному руслу.

В качестве подходящих носителей, наполнителей или разбавителей в композиции по настоящему изобретению можно использовать соль алюминия, феноксипропанол, воду,

35 физиологический раствор, лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, аморфную целлюлозу, поливинилпирролидон, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло.

Кроме того, композиция по настоящему изобретению дополнительно может включать

40 наполнитель, антикогезивный агент, лубрикант, увлажнитель, ароматизатор, эмульгатор и антисептик.

Композиция по настоящему изобретению может быть составлена обычным способом, хорошо известным в данной области, для индукции иммунного ответа у млекопитающего при одном (1) или более введениях.

45 Вакцину для лечения ожирения по настоящему изобретению можно вводить различными путями, такими как оральное, кожное, внутрикожное, внутривенное или внутримышечное введение, предпочтительно внутрикожное введение.

Эффективная доза вакцины по настоящему изобретению составляет 0,1-10 мкг (активного пептида) на кг массы тела, предпочтительно 0,5-1,0 мкг на кг. Однако

50 реальную дозу активного вещества вакцины можно определить в зависимости от нескольких факторов, таких как иммунный статус, пути введения, состояние пациента, возраст, пол, масса тела и тому подобное. Следовательно, пределы указанных доз никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Основным фармацевтическим действием вакцины по настоящему изобретению является профилактика или лечение ожирения посредством механизма, при котором антитела, индуцированные миметическим пептидом, его конкатемером или модифицированными пептидами, связываются с эпитопом аполипопротеина В-100 на поверхности LDL и тем самым стерически препятствуют и ингибируют липазу, которая участвует в образовании жирных кислот, являющихся основным этиологическим фактором ожирения.

Кроме того, вакцина по настоящему изобретению обладает действием подавлять гиперлипидемию посредством механизма, при котором LDL обнаруживается и легко удаляется макрофагом с помощью опсонизации, вызванной человеческими антителами, индуцированными миметическим пептидом, его конкатемером или модифицированными пептидами и конъюгированными с эпитопом аполипопротеина В-100 на поверхности LDL.

Другим фармацевтическим действием композиции по настоящему изобретению является профилактика или лечение ожирения путем подавления накопления липидов, таких как холестерин свободных жирных кислот в клетке, посредством механизма, при котором человеческие антитела, индуцированные миметическим пептидом, его конкатемером или модифицированными пептидами, связываются с эпитопом аполипопротеина В-100 на поверхности LDL, и тем самым препятствуют специфическому связыванию LDL с LDL-рецептором, расположенным на поверхности клеток.

Краткое описание фигур

Вышеуказанные цели и другие преимущества настоящего изобретения станут более понятными при подробном описании его предпочтительного осуществления при обращении к прилагаемым фигурам, на которых:

На фигурах 1a-1d представлены структуры и состав вектора для экспрессии миметического пептида по настоящему изобретению. На фиг. 1a представлена структура лидерной кассеты, на фиг. 1d представлена структура кассеты LB, на фигуре 1c представлена структура кассеты BL и на фигуре 1d представлена структура вектора экспрессии рВХ4.

На фигуре 2 представлены способы получения вектора рВХ1 и рВХ4 для экспрессии миметического пептида по настоящему изобретению.

На фигуре 3 представлены результаты электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE), проведенного для идентификации кассеты LB.

На фигуре 4 представлены результаты PAGE, проведенного для идентификации кассеты BL, включенной в плазмиду рBlue-BL.

На фигуре 5 представлены результаты PAGE, проведенного для подтверждения направления и числа копий ДНК, вставленной в плазмиду рВХ1 и рВХ3.

На фигуре 6 представлены результаты вестерн-блоттинга, проведенного для идентификации экспрессированного пептида PBI₄.

На фигуре 7 представлены результаты PAGE с добавлением додецилсульфата натрия (SDS), проведенного для подтверждения очищенного пептида PBI₄.

На фигуре 8 представлены результаты вестерн-блоттинга, проведенного для подтверждения реакционной способности очищенного пептида PBI₄ против анти-PBI₄-сыворотки.

На фигуре 9 представлены результаты ELISA, проведенного для определения avidности мышинных антител, индуцированных пептидом PBI₄.

На фигуре 10 представлен график, который показывает подавляющее действие PBI₄ на увеличение массы тела мыши.

На фигурах 11a и 11b представлены графики, показывающие изменение массы тела мышей в зависимости от введения вакцины PBI₄ по настоящему изобретению через 20 недель после введения препарата, который может нарушить функцию гипоталамуса.

На фигуре 12 представлен график, который представляет влияние на концентрацию липидов в сыворотке крови при введении вакцины PBI₄.

Наилучший способ осуществления настоящего изобретения

В последующем настоящее изобретение будет описано подробнее. Однако настоящее изобретение, поясняемое ниже, представлено только для пояснения осуществления настоящего изобретения и не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения.

5 Пример 1: синтез и отжиг олигонуклеотида

Олигонуклеотиды получали химическим синтезом в Genemed Synthesis (San Francisco, CA, США) по последовательности, предоставленной настоящими заявителями. Для фосфорилирования 5'-конца олигонуклеотидов, 50 мкл 100 пмоль/мкл олигонуклеотида инкубировали с 10 мкл 10 мМ АТФ, 3 мкл 10 Е/мкл полинуклеотидкиназы Т4 (Takara, Otsu, Япония) и 7 мкл 10X буфера для киназы в течение двух (2) ч при 37°C.

10 Каждую аликвотную пробу объемом 10 мкл вышеуказанных фосфорилированных олигонуклеотидов смешивали вместе, нагревали при 80°C в течение 5 мин и затем медленно охлаждали до комнатной температуры, проводя таким образом отжиг с получением специфической конъюгации комплементарных цепей.

15 Пример 2: лигирование

Смесь для проведения лигирования готовили смешением 1 мкл ДНК-вектора, 5 мкл ДНК-вставки, 1 мкл ДНК-лигазы Т4 (NEB, Beverly, MA, США), 1 мкл 10X буферного раствора для ферментной реакции (NEB, Beverly, MA) и 2 мкл дистиллированной воды, затем инкубировали при 16°C в течение ночи.

20 Пример 3: конструирование экспрессирующего вектора рВХ для экспрессии миметического пептида аполипопротеина В-100

Стадия 1: планирование вектора

Плаزمид-вектор для экспрессии миметического пептида обычно включает лидерную кассету и один или более генов пептида РВ1. Как показано на фигуре 1, плазмиду рВХ1, которая включает один (1) ген РВ1, получали клонированием лидерной кассеты (фиг. 1а) в сайт для поликлонирования плазмиды рQE30 (Qiagen, Hilden, Германия). Полученную плазмиду расщепляли HindIII и Sall и небольшой фрагмент замещали кассетой LB (фиг. 1b) с получением плазмиды рВХ1, которая подходит для удобной вставки множественных количеств кассеты BL (фиг. 1с).

30 Между тем, плазмиду рBluescript II SK+ расщепляли Sall и XhoI и лигировали с кассетами BL, где имели место производные единичные-множественные вставки кассеты BL. Отбирали предполагаемые повторы генов пептида РВ1 в плазмиде рBlue-BL, вырезали и субклонировали в рВХ1 (фиг. 1d).

Стадия 2: получение вектора для экспрессии монопептида РВ1

35 Лидерную кассету готовили отжигом олигонуклеотидов с последовательностями SEQ.ID. № 10 и SEQ.ID. № 11, синтезированных таким же способом, как в примерах 1 и 2. Затем вектор рQE30 (Qiagen, Hilden, Германия), который был расщеплен Sall и BamHI, лигировали с вышеуказанной лидерной кассетой для получения плазмиды рQE-лидер. В результате экспрессии вышеуказанного вектора рQE30 дополнительно включали шесть остатков гистидина в N-конец экспрессированного белка для удобной очистки белка. Вышеуказанную лидерную кассету конструировали с включением сайта узнавания (DDDDKI; SEQ.ID. № 12) для энтерокиназы для уменьшения до минимума дополнительных аминокислот.

45 По способу примера 1 синтезировали четыре олигонуклеотида, последовательности которых представлены SEQ.ID. № 4-7, фосфорилировали и затем отжигали соответственно с комплементарными олигонуклеотидами для синтеза кассеты LB, представленной на фигуре 1b (SEQ.ID. № 13 и 14). 40 мкл отоженных олигонуклеотидов смешивали с 3 мкл 1 Е/мкл ДНК-лигазы Т4, 5 мкл 10X буфера для фермента и 2 мкл дистиллированной воды с получением смеси для лигирования. Затем смесь для лигирования инкубировали в течение 50 ночи для связывания олигонуклеотидов друг с другом.

После завершения реакции реакцию смесь наносили на 20% полиакриламидный гель и проводили электрофорез. Кассету LB (олигонуклеотиды размером 52 п.о.) (фиг. 3) идентифицировали при окрашивании геля этидиумом бромидом (EtBr).

На фигуре 3 полоса М является ступенчатым фрагментом ДНК размером 20 п.о., и полоса 1 представляет реакционный раствор. Кассету LB извлекали из геля с помощью набора для экстракции из геля QIAEX II (Qiagen, Hilden, Германия).

5 Вышеуказанную плазмиду рQE30-лидер расщепляли HindIII и Sall и затем лигировали с вышеуказанной кассетой LB, следуя способу в примере 2, с получением вектора для экспрессии миметического пептида PBI. Полученный экспрессирующий вектор называли рBX1 и пептид, экспрессированный вектором, называли пептидом PBI₁ (смотри фиг. 2).

Стадия 3: получение вектора для экспрессии конкатемера пептида PBI₁

10 По способу примера 1 синтезировали четыре олигонуклеотида, последовательности которых представлены SEQ.ID. № 4, 5, 8 и 9, фосфорилировали и затем отжигали соответственно с комплементарными олигонуклеотидами для синтеза кассеты BL на фигуре 1с (SEQ.ID. № 15 и 16). Затем данные олигонуклеотиды лигировали друг с другом по способу стадии 2 и затем наносили на 20% полиакриламидный гель для электрофореза. Идентифицировали олигонуклеотиды размером 55 п.о. (лидерная кассета) при
15 окрашивании геля EtBr. Кассету BL извлекали из геля с помощью набора для экстракции из геля QIAEX II и расщепляли Sall и XhoI.

Между тем, плазмиду рBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA, США) расщепляли Sall и XhoI. Вектор подвергали электрофорезу в 0,8% агарозном геле и извлекали с помощью набора для экстракции из геля QIAEX II (Qiagen, Hilden, Германия).

20 Проводили такую же реакцию лигирования, как в примере 2, для получения плазмиды рBlue-BL с использованием 5 мкл ДНК-кассеты BL и 1 мкл вышеуказанного вырезанного ДНК-вектора.

рBlue-BL расщепляли Sall и XhoI и экстрагировали кассету BL. Плазмиду рBX2 получали вставкой данной кассеты BL в сайт Sall вектора рBX1, полученного на стадии 2. Кроме
25 того, получали векторы рBX3 и рBX4, приготовленные изменением числа кассет BL, которые вставляли в сайт Sall вектора рBX1, с двух (2) до трех (3) (смотри фиг. 2).

Пептиды, экспрессированные векторами рBX2, рBX3 и рBX4, представляли конкатемер, который включал два (2) - четыре (4) пептида PBI. Они были названы соответственно PBI₂, PBI₃ и PBI₄.

30 Стадия 4: идентификация вставки

Клетки-хозяева (E.coli M15 [pREP4]; Qiagen, Hilden, Германия) трансформировали плазмидой рBlue-BL и высевали на чашку с 1% агаром и затем инкубировали в течение 16 ч при 37°C для того, чтобы могли образоваться колонии E.coli. Одну из колоний, образовавшихся на чашке с агаром, вносили в 10 мл среды LB и инкубировали при
35 встряхивании при 37°C в течение шестнадцати (16) ч и затем выделяли плазмиду с помощью системы для очистки ДНК (Wizard PLUS SV DNA miniprep DNA purification system; Promega, Madison, WI, США). Плазмиду, выделенную из трансформированной E.coli, инкубировали с рестриктазами Sall и XhoI для расщепления при 37°C в течение одного (1) ч и анализировали 20% PAGE (фиг. 4). На фигуре 4 полоса М является ступенчатым
40 фрагментом ДНК размером 20 п.о., полоса 1 представляет олигонуклеотидный продукт, полученный на стадии 3, полоса 2 представляет ДНК кассеты BL, выделенной 20% PAGE на стадии 3, и полоса 3 представляет рекомбинантную плазмиду рBlue-BL, обработанную рестриктазами. Как представлено на фигуре 4, было подтверждено, что плазида рBlue-BL содержала кассету BL.

45 E.coli (M15[pREP4]) трансформировали плазмидой рBX1 или рBX3 и ДНК плазмиды выделяли, как пояснено выше, для подтверждения числа и ориентации вставок в ДНК кассеты. Выделенную плазмиду расщепляли рестриктазами Sall и HindIII и анализировали 20% PAGE (фиг. 5). На фигуре 5 полоса М является ступенчатым фрагментом ДНК размером 20 п.о., полосы 1 и 3 представляют плазмиду рBX1, содержащую кассету LB, но
50 не BL, полоса 2 представляет плазмиду, несущую одну кассету LB и две BL с нужным направлением. С другой стороны, полоса 4 представляет плазмиду, имеющую одну кассету LB и две BL, однако, в обратном направлении. Как показано на фигуре 5, по тому, как много кассет В (кассет BL или LB) было вставлено и в каком направлении они были

вставлены в вектор рВХ, можно получить карту воздействия рестриктаз.

Кроме того, было подтверждено, что последовательность ДНК кассет В, включенных в плазмиду, которая была получена из трансформированной *E.coli*, идентична желаемым последовательностям. Плазмиды получали с помощью набора Wizard PLUS DNA miniprep и секвенировали с использованием набора для секвенирования ДНК Sequennase (Ver. 2.1) (Amersham, Cleveland, Великобритания).

Пример 4: экспрессия пептида РВІ₄ в *E.coli* и его выделение

Стадия 1: подтверждение экспрессии пептида РВІ₄

Для подтверждения экспрессии пептида РВІ₄ три вида трансформированных *E.coli* М15 [рREP4] культивировали в бульонном агаре LB, содержащем ампициллин и канамицин. Один вид *E.coli* М15[рREP4] трансформировали плазмидой рВХ4, другой - ложно трансформировали рQE30, и еще один представлял нетрансформированную *E.coli* М15 [рREP4]. Каждую из образовавшихся колоний переносили с твердой среды соответственно в жидкую среду LB, которая содержала 100 мкл/мл ампициллина и 25 мкл/мл канамицина, и инкубировали в течение ночи. Культуру инкубировали при 37°C в течение одного (1) часа при встряхивании, пока оптическая плотность при 600 нм не достигала пределов 0,5-0,7. Затем в культуральную среду вносили 1 мМ изопропилтио-β-галактопиранозид (IPTG) для усиления экспрессии рекомбинантного белка и дополнительно культивировали при 37°C в течение пяти (5) ч. Отбирали 1 мл культуральной среды и центрифугировали при 14000 об/мин в течение двух (2) мин для осаждения бактериальных клеток. Клеточный осадок, полученный при центрифугировании, суспендировали в 50 мкл 2X раствора SDS [100 мМ Трис-Cl, pH 6,8, 20% глицерина (мас./об.), 4% SDS (мас./об), 2% 2-меркаптоэтанола, 0,001% бромфенола синего] для проведения SDS-PAGE. Суспендированный раствор нагревали при 95°C в течение пяти (5) мин, и затем 10 мкл раствора вносили в лунку залитого геля и проводили электрофорез при 20 мА в течение пяти (5) ч (Mighty Small II, Hoefer, США). Концентрация акриламида в концентрирующем геле и разделяющем геле, которые использовали, соответственно равнялась 5% и 15%, и использовали в качестве стандарта белка-маркера размера предварительно окрашенный стандарт SeeBlue (250 kDa - 4 kDa; NOVEX, San Diego, CA, США) и стандарт с широким пределом Mark12 (200 kDa - 2,5 kDa). После проведения электрофореза гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим R-250 в течение одного (1) ч и краситель удаляли обесцвечивающим раствором (5% метанола и 7% уксусной кислоты) в течение десяти (10) ч.

Для подтверждения того, что экспрессированный белок представлял собой пептид РВІ₄, белки в геле для электрофореза подвергали вестерн-блоттингу с использованием кроличьих анти-РВ1-антител (фиг. 6). Антисыворотку получали иммунизацией яичным белком, конъюгированным с пептидом РВІ, полученным химическим синтезом в Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX, США). На фигуре 6 полоса М является меткой предварительно окрашенного стандарта SeeBlue, полоса 1 представляет среду, использованную для инкубации *E.coli* М15[рREP4], которую не трансформировали, полоса 2 представляет среду, использованную для инкубации *E.coli* М15[рREP4], которую трансформировали вектором рQE30, полоса 3 представляет среду, использованную для инкубации *E.coli* М15[рREP4], которую трансформировали вектором рВХ4.

Как представлено на фигуре 6, только трансформированная рВХ4 *E.coli* экспрессировала рекомбинантный пептид РВІ₄, обладающий специфическим иммунитетом в отношении мышиной анти-РВІ-сыворотки.

Стадия 2: определение растворимости экспрессированного пептида

E.coli М15[рREP4], которая была трансформирована вектором рВХ4, инкубировали таким же способом, как на стадии 1. Отбирали 10 мл культуральной среды и центрифугировали для сбора клеток. Клеточный осадок, полученный при центрифугировании, суспендировали в 5 мл раствора для лизиса клеток (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ имидазола, pH 8,0) с получением естественного белка из клеток. После охлаждения раствор с суспендированным осадком обрабатывали ультразвуком при 20 циклах для лизиса клеток. Супернатант получали центрифугированием при 4°C, 10000

об/мин в течение 30 мин. С раствором смешивали такой же объем 2X раствора SDS и проводили SDS-PAGE таким же способом, как описано на стадии 1. Затем каждый раствор прогревали при 95°C в течение 5 мин. В результате проведения SDS-PAGE было подтверждено, что пептид PBI₄ можно выделить и очистить из растворимого экстракта А, входящего в состав нерастворимого неочищенного экстракта В.

Стадия 3: очистка пептида PBI₄

Стадия 3-1: аффинная хроматография

Для очистки рекомбинантного пептида, полученного на стадии 1, использовали смолу Ni-NTA для очистки His-меченых белков. Аффинная хроматография с использованием силы притяжения между насыщенным в смоле Ni⁺ и остатков гистидина на конце экспрессированного белка является хорошо известным методом удобной очистки интересующего белка.

Прежде всего, E.coli M15[rREP4], которую трансформировали pBX4, вносили в 1 л культуральной среды LB и инкубировали при 37°C до того, как оптическая плотность при 600 нм была выше 0,6. Соотношение культуральной среды LB и вектора pBX4 составляло пятьдесят (50) к одному (1). IPTG добавляли до конечной концентрации 1 мМ и вновь инкубировали в течение пяти (5) ч. После инкубации клеточный осадок получали центрифугированием культуральной среды при 6000g в течение 30 мин, и осадок хранили при -70°C в течение ночи. Осадок, оттаявший на льду, суспендировали в растворе для растворения (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ имидазола, pH 8,0), при этом использовали 5 мл раствора для растворения на 1 г осадка. Клетки лизировали обработкой ультразвуком таким же способом, как на стадии 2, и затем центрифугировали при комнатной температуре при 10000g в течение 30 мин. Такой же объем буфера (8М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Трис-НСl, pH 8,0), как и осадок, добавляли к клеточному дебрису для ресуспендирования и для денатурации белков в них, и раствор суспендированного осадка обрабатывали ультразвуком для того, чтобы больше белков могло раствориться в буфере. Суспензию центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточного дебриса, который не солюбилизировался в 8М мочеvine. К 4 мл вышеуказанного супернатанта добавляли 1 мл смолы Ni-NTA при 4°C и встряхивали при 200 об/мин в течение 2 ч для захвата белков, включающих His-метку.

Данный супернатант, содержащий комплекс белок/Ni-NTA осторожно наносили на хроматографическую колонку (размеры: 2 см (внутренний диаметр) × 2,7 см (высота)). После оседания смолы при открытии крышки пропускали избыток буфера. Колонку промывали 20 мл буфера для создания pH среды (8М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Трис-НСl, pH 8,0) и затем 20 мл другого буфера (8М мочевины, 0,1М NaH₂PO₄, 0,01 М Трис-НСl, pH 6,3) для вымывания белков, которые не были специфически связаны со смолой Ni-NTA. Целевые белки, содержащие His-метку, элюировали два (2) раза 5 мл буфера с низким pH (8М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Трис-НСl, pH 5,9), затем четыре (4) раза 5 мл сильно кислого буфера (8М мочевины, 0,1 М NaH₂PO₄, 0,01 М Трис-НСl, pH 4,5) и затем использовали SDS-PAGE для подтверждения элюированных целевых белков с использованием 15% акриламидного геля (фиг. 7). На фигуре 7 полоса М является предварительно окрашенным маркером размера SeeBlue, и полоса 7 представляет очищенный пептид PBI₄.

Вышеуказанные очищенные белки диализовали против PBS (8 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,44 г/л NaH₂PO₄, 0,24 г/л KH₂PO₄) для восстановления их первоначальной конформации. Использованные пробирки для диализа были с ограничением молекулярной массы 3500 Da. Во время диализа вначале в течение 5 ч использовали 3 л PBS, содержащего 2М мочевины, и затем использовали два (2) раза в течение ночи 5 л PBS без мочевины.

Стадия 3-2: гидрофобная хроматография

Гидрофобную хроматографию проводили для повышения чистоты пептида PBI₄, который получали на стадии 3-1.

Сульфат аммония постепенно добавляли до конечной концентрации, равной 20%, к раствору, содержащему пептид PBI₄, который элюировали со смолы Ni-NTA на стадии 3-1,

и затем pH доводили до 7,0. Раствор выдерживали в течение трех или более часов, после того как полностью расплавилось 10% сульфата аммония, и затем раствор наносили на колонку с фенилсефарозой [наполнение: фенилсефарозная смола для быстрого элюирования (Pharmacia, Швеция); размеры колонки: 1 см (внутренний диаметр) × 3 см (высота)].

Каждую фракцию, которую элюировали из колонки пропусканием элюента (8M мочевины, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Трис- HCl , pH 6,3) через колонку со скоростью элюента 0,5 мл/мин при обращенном градиенте сульфата аммония от 10% до 0%, наносили на гель для SDS-PAGE. Собирали фракцию, содержащую пептид PBI₄, и диализовали в буферном растворе для обессоливания, и в то же самое время удаляли мочевину, которую использовали в качестве денатурирующего агента.

Стадия 3-3: удаление His-метки

2M мочевину добавляли к буферному раствору (50 mM NaCl, 20 mM Трис- HCl , 2 mM CaCl_2 , pH 7,4), который был пригоден для удаления денатурирующего агента и имидазола и т.д. из очищенного His-меченого белка и также активации энтерокиназы. Диализованный пептид PBI₄, полученный на стадии 3-2, вновь диализовали с использованием указанного содержащего мочевину буфера для обессоливания пептида PBI₄, и во время чего концентрацию мочевины постепенно снижали повторным диализом против буфера с пониженным содержанием мочевины. К раствору, содержащему пептид PBI₄, в котором буфер заменяли на указанный второй буфер, добавляли 3 Е/мл энтерокиназы и инкубировали при 23°C. Раствор отбирали каждый час, затем анализировали при помощи SDS-PAGE для проверки удаления His-метки из His-меченого пептида PBI (PBI₄^{+his}).

Стадия 3-4: ионообменная хроматография

Нежелательные белки и пептиды, которые образовались в результате обработки энтерокиназой, удаляли ионообменной хроматографией.

Раствор, содержащий пептид PBI₄^{-his}, который получали на стадии 3-3, диализовали в буфере для диализа (2M мочевины, 0,1 M NaH_2PO_4 , 0,01 M Трис- HCl , pH 7,0) и буфер в значительной степени обменивался. Раствор, который диализовали, наносили на смолу с DEAE-сефарозой (Pharmacia, Uppsala, Швеция). Затем колонку уравнивали буфером для уравнивания (50 mM натриевого фосфатного буфера, 2M мочевины, pH 7,0) и пептид элюировали в градиенте концентрации NaCl от 0 до 1M с использованием другого буфера (50 mM натриевого фосфатного буфера, 2M мочевины, 1M NaCl)(скорость элюента: 0,5 мл/мин). Получали каждую фракцию и накапливали содержащую целевой белок фракцию. Присутствие пептида PBI₄^{-his} подтверждали с помощью SDS-PAGE после концентрирования отсеков.

Стадия 4: количественный анализ PBI₄

Очищенный пептид PBI₄, который получали таким же способом, как на стадии 3, анализировали количественно колориметрическим методом с использованием реагента ВСА для микроанализа (Pierce, Rockford, США).

Стадия 5: подтверждение свойств рекомбинантного пептида PBI₄

Чистоту пептидов PBI₄, которые выделяли на стадии 3, и их иммуногенность против антисыворотки, которую получали с использованием синтетического пептида PBI₄ в качестве антигена, определяли вестерн-блоттингом с помощью ECL (Amersham, Cleveland, Великобритания). После SDS-PAGE (пример 2, стадия 1) гель инкубировали вместе с мембраной PVDF в буфере (0,3% Трис, 1,5% глицина, 20% метанола) при постоянном напряжении 60 В в течение трех (3) ч для переноса белка с геля на мембрану PVDF. Затем блоттированную мембрану инкубировали с 5 мл блокирующего раствора (TBS, pH 7,5, 5% сухого обезжиренного молока (мас./об.), 0,02% Твин-20) в течение 1,5 ч и затем три раза промывали ТТБС (забуференный Трисом физиологический раствор, содержащий 0,1% Твина-20) соответственно в течение 15 мин, 5 мин и 5 мин. Антисыворотку против пептида PBI (смотри стадию 1 в примере 2) разбавляли раствором ТТБС в соотношении один (1) к пяти тысячам (5000) и затем инкубировали с мембраной в течение 1,5 ч. Для подтверждения чистоты пептида PBI₄ использовали антисыворотку

против пептида PBI₄ (пример 3). После промывания геля TTBS три раза соответственно в течение 15 мин, 5 мин и 5 мин, мембрану инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре с раствором, в котором конъюгированный с щелочной фосфатазой F(ab)₂-козий антимышиный IgG (H+L) (Zymed, San Fransisco, CA) разбавляли раствором TTBS в соотношении один (1) к одной тысяче (1000). Мембрану вновь промывали три раза TTBS и затем окрашивали при добавлении BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфата/нитросинего тетразолия (Sigma)). Раствор BCIP/NBT удаляли с использованием раствора TTBS после окрашивания. В результате вестерн-блоттинга экспрессированный пептид PBI₄ можно было распознать с помощью анти-PBI₄-сыворотки.

В случае ECL, мембрану PVDF (Gelman Science, BioTrace^R) использовали вместо нитроцеллюлозной мембраны. Кроме того, первые антитела использовали в соотношении один (1) к десяти тысячам (10000) и HRP-конъюгированный кроличий антимышиный IgG (Pierce, Rockford, IL, США) использовали в качестве вторых антител в соотношении один (1) к десяти тысячам (10000). 1 мл раствора А реагента для вестерн-блоттинга ECL+Plus (Amersham) на 25 мл раствора В использовали в цветной реакции. Когда окраска в достаточной мере развивалась, мембрану вставляли в пленочную кассету соответственно на 5, 10, 20 и 30 сек для воздействия пленки, чтобы полосы на геле можно было детектировать (фиг 8). На фигуре 8 полоса М является ECL детектирующей меткой (Gibco BRL), и полоса 1 представляет пептид PBI₄. Как следует из фиг. 8, экспрессированный пептид PBI₄ можно было распознавать с помощью анти-PBI₄-сыворотки.

Кроме того, вестерн-блоттинг, при котором пептид PBI₄ с использованием поликлональных антител, выделенных из кроличьей сыворотки, при применении колонки с белком G (Bio-Rad, США) давал те же результаты.

Пример 5: получение мышинных анти-пептид PBI₄-антител

Использованный в данном случае пептид PBI₄ представлял пептид PBI₄^{-his}, из которого была удалена his-метка на стадии 3-3 примера 2.

Стадия 1: лигирование пептида PBI₄ и OVA

В качестве белка-носителя овальбумин (OVA) добавляли к очищенному на стадии 3 в примере 2 пептиду PBI₄, в молярном соотношении один (1) к десяти (10), и инкубировали в течение одного (1) ч при 4°C. К раствору пептид PBI₄-овальбумин добавляли 2% (об./об.) глутарового альдегида в том же объеме и инкубировали в течение одного (1) ч при постоянном встряхивании. Затем к реакционной смеси добавляли глицин, пока конечная концентрация не становилась равной 0,2 М, для остановки реакции.

После реакции оставшийся в реакционной смеси глутаровый альдегид-глицин удаляли диализом с использованием мембраны для диализа MWCO 12000-14000 (Spectrum^R, Dominguez, CA, США).

Стадия 2: иммунизация мышей

Пептид, с которым связывали OVA на стадии 1, концентрировали и использовали для иммунизации мышей. Количество антигена, которое вводили мышам, составляло 5 мкг, что равнялось количеству пептида PBI₄ до связывания с OVA. Антиген, эмульгированный таким же количеством адъюванта, вводили мышам внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл.

Полный адъювант Фрейнда (CFA) использовали в качестве адъюванта для первой инъекции и неполный адъювант Фрейнда (IFA) использовали в качестве адъюванта при бустер-иммунизации два (2) раза с двух-(2)-недельным интервалом. Контрольным мышам вводили BSA (бычий сывороточный альбумин).

Через пять (5) дней после последней инъекции у мышей отбирали 1 мл крови при пункции сердца, и кровь сворачивалась в течение 30 мин при 37°C. Затем кровь центрифугировали в течение 30 мин при 4°C, 2500g и сгусток удаляли из крови.

Супернатант (т.е. сыворотку крови) инкубировали в течение ночи при 4°C для полного концентрирования оставшихся коагулированных веществ крови и центрифугировали в течение 20 мин при 10000g. Полученный супернатант разливали в несколько пробирок. Сыворотку крови, которую использовали в опыте, хранили при 4°C, остальное хранили при

-20°C.

Стадия 3: определение avidности анти-PBI₄-антител непрямого ELISA

Авидность антител определяли с использованием сыворотки крови, полученной на стадии 2. По 100 мкл пептида PBI₄ вносили в каждую лунку 96-луночного планшета для микротитрования (Falcon: про-связывание) и его оставляли одного при 4°C в течение 6 ч или более и затем три (3) раза промывали ТТBS (забуференный Трисом физиологический раствор, содержащий 0,05% Твин-20). В каждую лунку добавляли 200 мкл блокирующего раствора (1% BSA в ТТBS) и инкубировали при 37°C в течение одного (1) ч и затем промывали три (3) раза ТТBS. 100 мкл выделенной сыворотки, разбавленной блокирующим раствором в соотношении один (1) к 10²-10⁵, добавляли к реакционному раствору и инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем промывали три (3) раза по 200 мкл ТТBS. 100 мкл HRP-конъюгированных анти-кроличьих IgG антител (Pierce, Rockford, IL), разбавляли блокирующим раствором в соотношении один (1) к 10³, добавляли к реакционному раствору и инкубировали при 37°C в течение 1 ч и промывали три (3) раза по 200 мкл ТТBS. Раствор А набора субстратов HRP (Bio-Rad) смешивали с раствором В в соотношении девять (9) к одному (1). 100 мкл полученной смеси добавляли к реакционному раствору и окрашивали в течение тридцати (30) мин и затем определяли оптическое поглощение реакционной смеси при 405 нм, как в случае анализа ELISA (EL312e, Bio-Tek Ins.)(фиг. 9). На фигуре 9 показано, что мышинные антитела, специфические к пептиду PBI₄, можно использовать для вестерн-блоттинга и ELISA при тысячном (1) разведении (3,0 на оси X на фигуре).

Пример 6: действие вакцины PBI₄ против ожирения с использованием модели на мышах
Стадия 1: индукция ожирения у мышей

В данном случае использовали мышей ИСК в возрасте 5 недель (Корейский центр по проведению опытов на животных, Сеул, Корея). Мышей выращивали в питомнике, в котором температуру поддерживали при 17-25°C и кормили смешанным кормом (Sam Yang Feed Ltd., Seoul, Корея [ингредиенты: вода 11,8% или более, белок 20,0% или более, сырые липиды 3,0% или более, сырая клетчатка 10,0% или ниже, сырая зола 10,0% или ниже, кальций 0,6% или ниже и фосфор 0,4% или более]. Для индукции ожирения мышам вводили голдтиоглюкозу (GTG). GTG обладает способностью индуцировать десенсибилизацию вентро-медиальных ядер гипоталамуса (VMH). Следовательно, мыши, которым вводили GTG, не чувствовали сытости, и у них всегда имелось желание есть. Используемая в данном случае GTG является очень нестабильным соединением, которое легко разлагается в воде или при наличии влаги. Следовательно, 100 мг GTG (Sigma, Inc.) разбавляли 1 мл кунжутного масла (Sigma, Inc.) и использовали по методу Brecher et al. (Brechere G. and Waxler S.H. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70: 498-501 (1949)) для введения нужного количества GTG.

Мышей распределяли для формирования опытной (двадцать (20) мышей) и контрольной группы (четыре (4) мыши) и животным опытной группы вводили 25 мкл GTG, в то время, как контрольной группе ничего не вводили.

До опыта определяли массу тела мышей в опытной группе, и были отобраны и использованы в опыте мыши, у которых отклонение в массе тела было незначительным. Значения массы тела, определенные у мышей через одну (1) неделю после введения GTG, находились в пределах 26,5-29,5 г.

У семи мышей в группе с введением GTG было индуцировано ожирение, в то время как у остальной части нет. Мышам, у которых не было индуцировано ожирение, вновь вводили GTG, и в этом случае у всех мышей было индуцировано ожирение.

Всех мышей с индуцированным ожирением распределяли на три (3) группы. Через неделю после второго введения GTG мышам опытной группы 1, состоящей из семи (7) мышей, вводили пептид PBI₄, полученный на стадии 2 примера 3. Кроме того, мышам (опытная группа 2, состоящая из семи (7) мышей) другой группы из трех вводили овальбумин вместо пептида PBI₄ в качестве ложного опыта и вакцину не вводили другой группе (опытная группа 3, состоящая из шести (6) мышей) с индуцированным ожирением. С

другой стороны, 0,2 мл PBC вводили контрольной группе для сравнения с опытными группами в целях подтверждения действия вакцины по настоящему изобретению.

Кроме того, корм, использованный в данном случае, смешивали с яичным желтком и высушивали при 50°C для повышения потребления холестерина таким образом, чтобы уровень холестерина в сыворотке крови мышей мог повышаться. Корм обеспечивали в достаточном количестве, чтобы вызвать заболевание, связанное с уровнем холестерина. Каждый день определяли массу тела у мышей.

Как показано на фигуре 10, масса тела мышей, которым вводили вакцину в опытной группе 1 (-▲-▲-) возросла с $27,7 \pm 0,4$ г до $52,2 \pm 1,7$ г через 12 недель после введения GTG. Данные дают основание сделать заключение о том, что достоверное различие в повышении массы тела у мышей опытной группы 1 и контрольной группы (-○-○-) отсутствовало. Однако масса тела у мышей опытной группы 2 (-●-●-), которым вводили овалбумин после возникновения ожирения и опытной группы 3 (-■-■-), которым после индукции ожирения вакцину не вводили, постоянно возрастала от $28,3 \pm 0,5$ г до $68,9 \pm 2,8$ г. Следовательно, было показано, что ожирение можно подавлять введением вакцины на основе пептида PBI₄.

На фигуре 10 G1 и G2 представляют время введения GTG и V1, V2 и V3 представляют время введения вакцины на основе пептида PBI₄.

На фигуре 11 представлен внешний вид мыши с индуцированным ожирением. Мышь в возрасте 20 недель из опытной группы 1 (фиг. 11a: нормальная мышь) сравнивали с мышью в возрасте 20 недель из опытной группы 3 (фиг. 11b: мышь с ожирением). Как показано на фиг. 11, было подтверждено, что вакцина по настоящему изобретению эффективна для подавления ожирения.

Стадия 2: определение уровня холестерина в крови

После первого введения GTG сравнивали уровень холестерина в крови у мыши в возрасте 12 недель из контрольной группы с таковым у мыши в возрасте 12 недель, которой вводили GTG, из опытной группы 1 и 2. Концентрацию общего холестерина, триглицеридов, HDL-холестерина и LDL-холестерина определяли ферментативным методом с использованием наборов Cholestezyme-V, Triglyzyme-V, HDL-C555 (Shin Yang Chemicals, Seoul, Корея) и LDL-EX (Denka Bio-Research, Ltd., Токио, Япония). В каждом опыте по данным оптической плотности строили калибровочную кривую с использованием стандартного калибратора-D (Denka Bio-Research, Ltd., Токио, Япония) для уменьшения ошибки опыта. Интересующее значение оптической плотности определяли по калибровочной кривой для установления концентрации и состава липидов, полученные данные представлены в таблице 1 и на фигуре 12.

Таблица 1

	Общий холестерин	TG	HDL-C	
Контроль	79 ± 3.7	180 ± 26	59 ± 3.4	
Опытная группа 1	118 ± 3.6	217 ± 47	92 ± 4.7	20 ± 1.7
Опытные группы 2 и 3	131 ± 8.8	218 ± 70	119 ± 7.5	30 ± 4.5
TG: триглицериды, HDL-C: HDL-холестерин, LDL-C: LDL-холестерин				

Как представлено в таблице 1 и на фигуре 12, в результате индукции ожирения было показано, что достоверное различие в составе холестерина у мышей в опытных группах и контроле отсутствовало, в то время как в целом концентрация в крови общего

холестерина, HDL-C и LDL-C незначительно повышалась.

Промышленная применимость

Вакцина по настоящему изобретению, которая содержит миметический пептид для эпитопа аполипопротеина В-100, его конкатемеры и модифицированные пептиды, может подавлять возникновение ожирения, не вызывая аутоиммунных реакций в организме.

Следовательно, циркуляторное заболевание, связанное с LDL, можно лечить вакциной по настоящему изобретению более эффективно, чем временными и дорогостоящими обычными способами, при которых ингибируется фермент, связанный с обменом холестерина.

Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно показано и описано при обращении к его конкретным примерам, специалистам в данной области, очевидно, понятно, что можно осуществить различные изменения в форме и деталях, не отступая от сущности и объема настоящего изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

Формула изобретения

1. Конкатемер пептида, индуцирующий выработку антител против аполипопротеина В-100, которые ингибируют действие липазы и препятствуют связыванию LDL с рецептором LDL, где указанный конкатемер включает четыре (4) пептида, аминокислотная последовательность каждого из которых представлена в SEQ.ID. №1.

2. Вакцина для лечения или профилактики ожирения, которая включает конкатемер по п.1.

3. Вакцина по п.2, где указанную вакцину вводят путем внутрикожной инъекции.

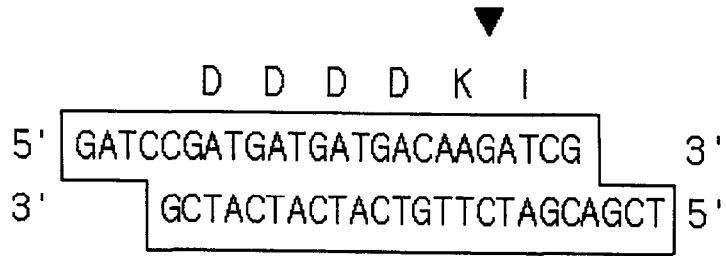
4. Вакцина по п.2, где тип указанной вакцины выбран из группы, состоящей из таблеток, пилюль, гранул, облаток, эликсиров, суспензий, эмульсии, раствора, сиропов, аэрозолей, мягких или твердых желатиновых капсул, стерильного раствора для инъекций и стерильного порошка.

5. Способ получения конкатемера по п.1, который включает

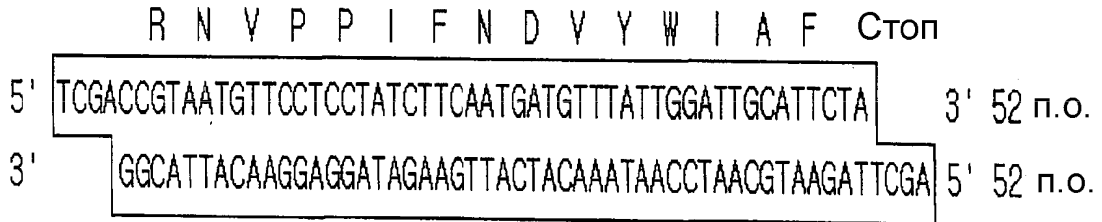
- i) стадию вставки полинуклеотида, кодирующего генетическую информацию о конкатемере по п.1, в вектор;
- ii) стадию трансформации E.coli вектором, полученным на стадии i), и инкубации трансформированных E.coli;
- iii) стадию выделения конкатемера по п.1 из E.coli, инкубированных на стадии ii).

6. Полинуклеотид, кодирующий конкатемер по п.1.

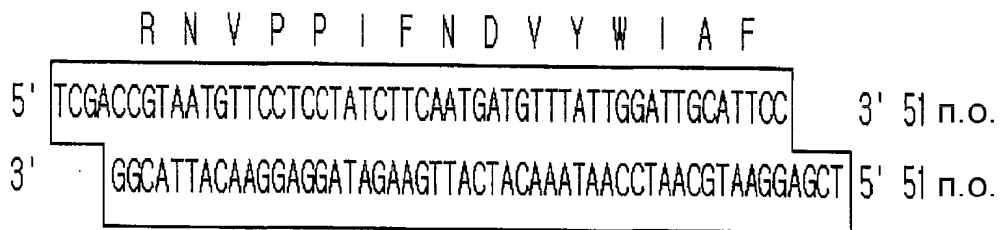
7. Экспрессирующий вектор, который включает полинуклеотид, кодирующий конкатемер по п.1.



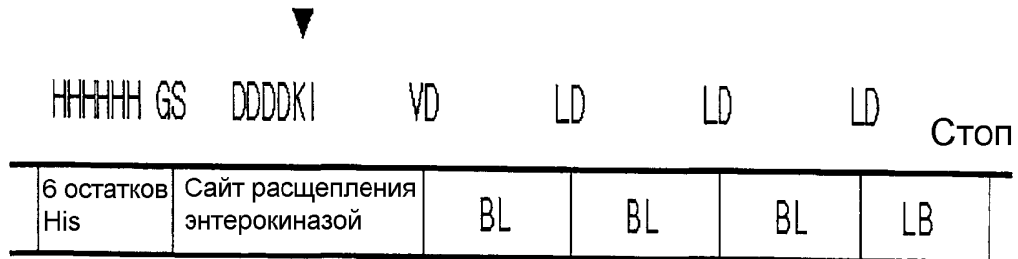
ФИГ. 1а



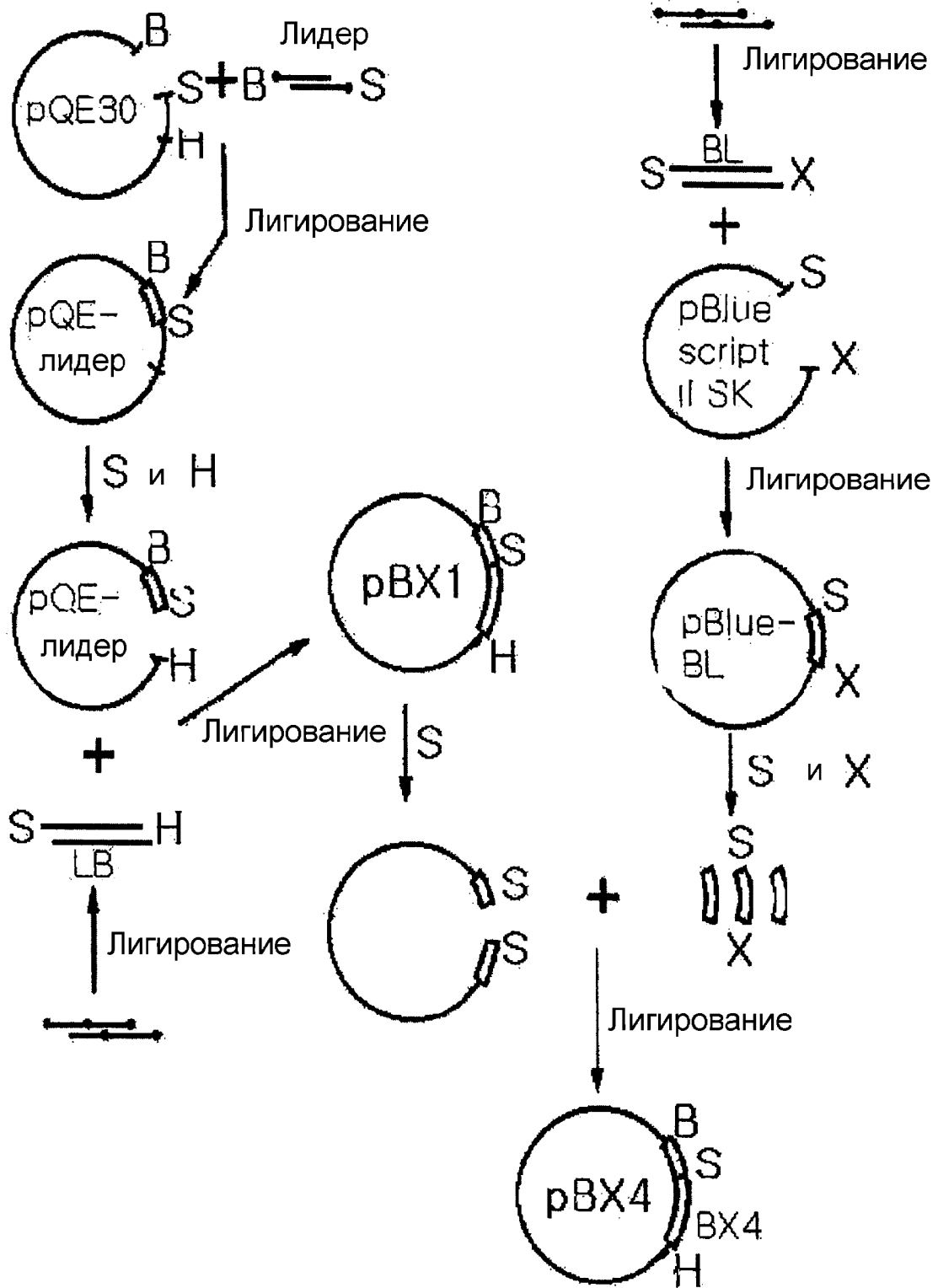
ФИГ. 1б



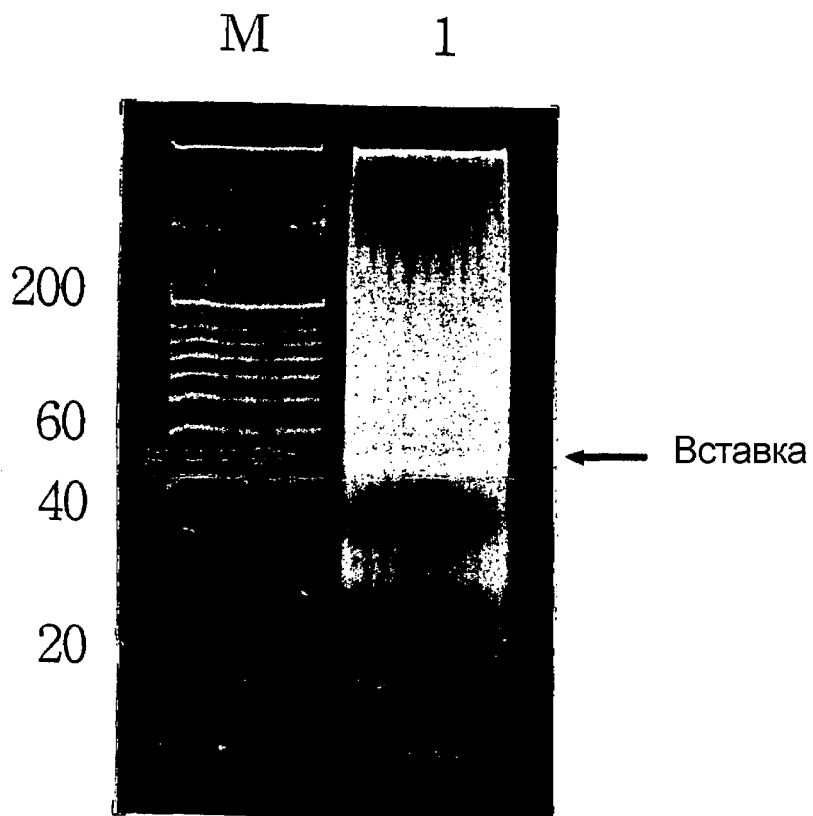
ФИГ. 1с



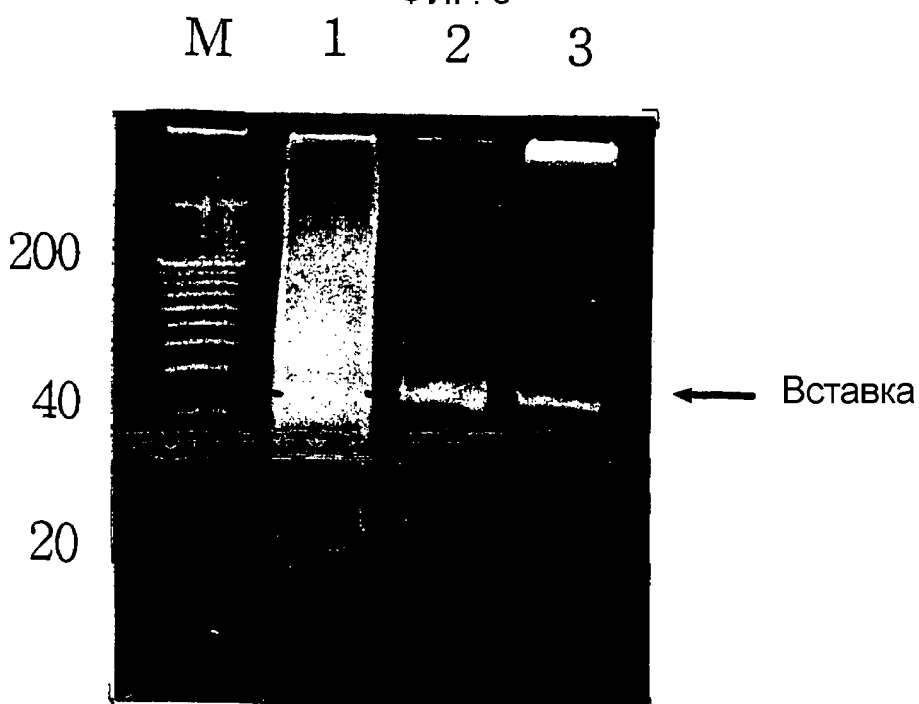
ФИГ. 1d



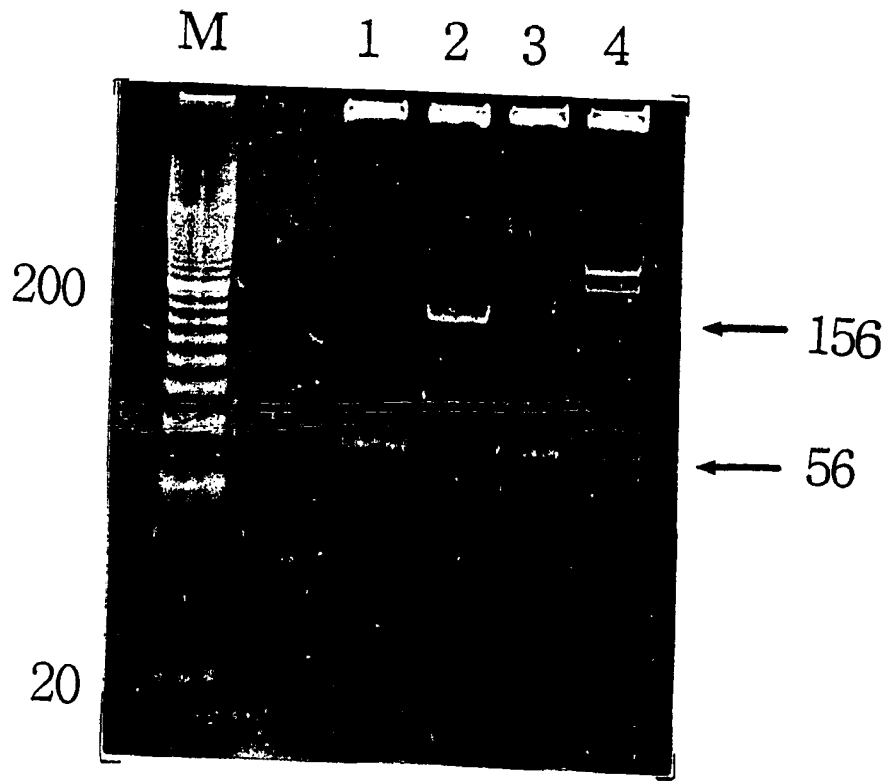
ФИГ. 2



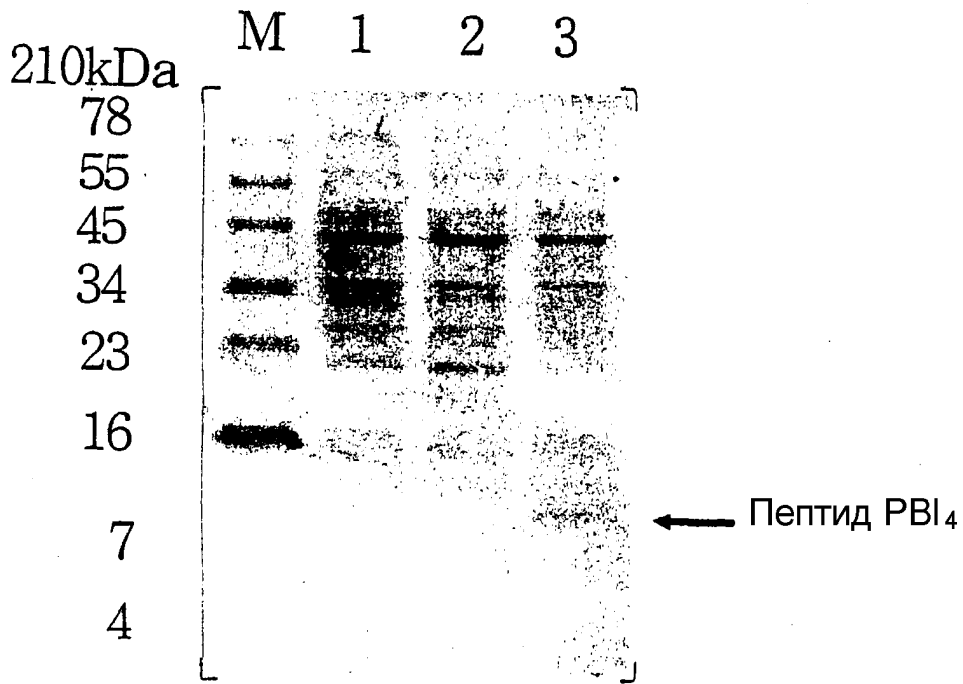
ФИГ. 3



ФИГ. 4

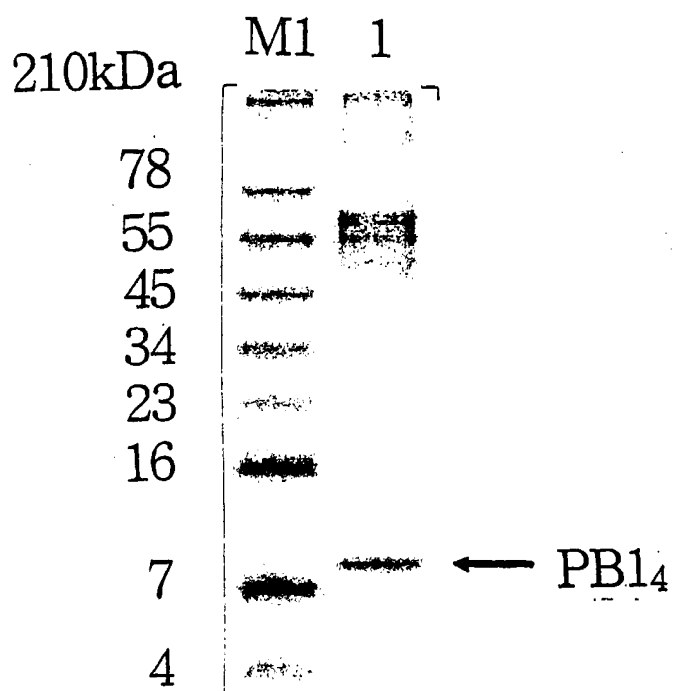


ФИГ. 5



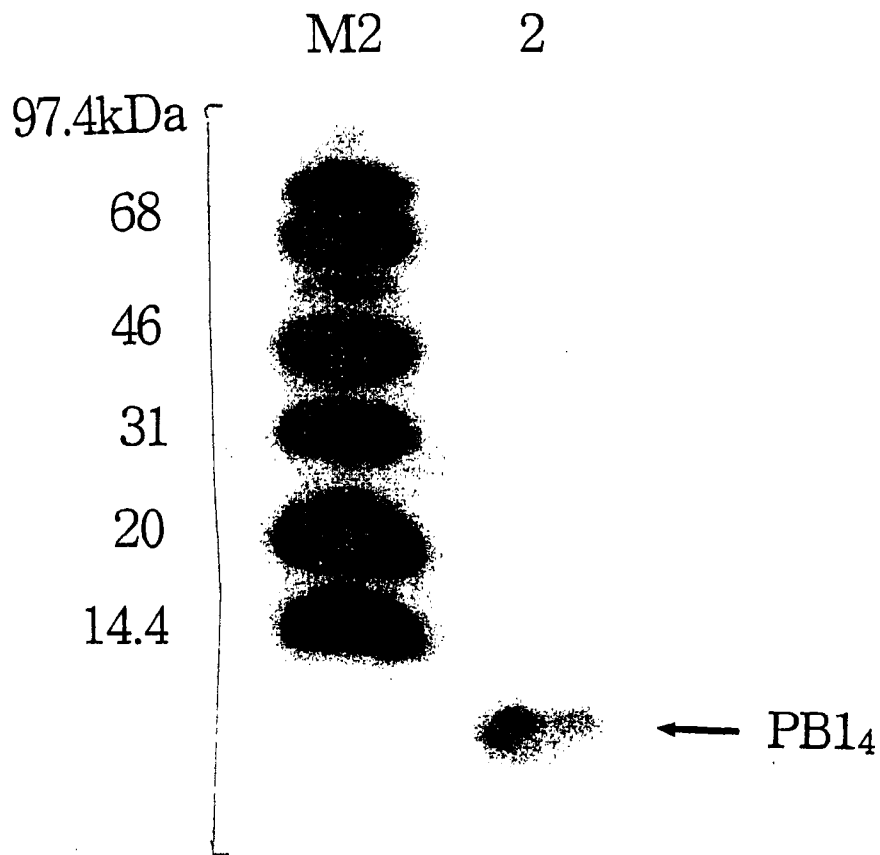
ФИГ. 6

A.

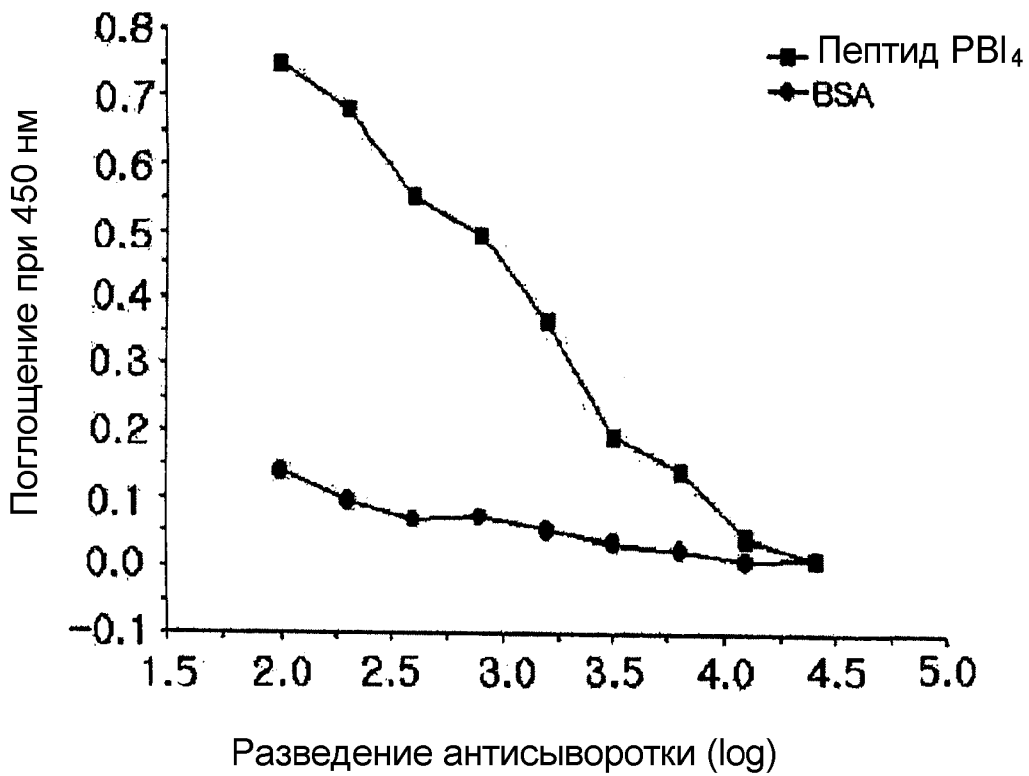


ФИГ. 7

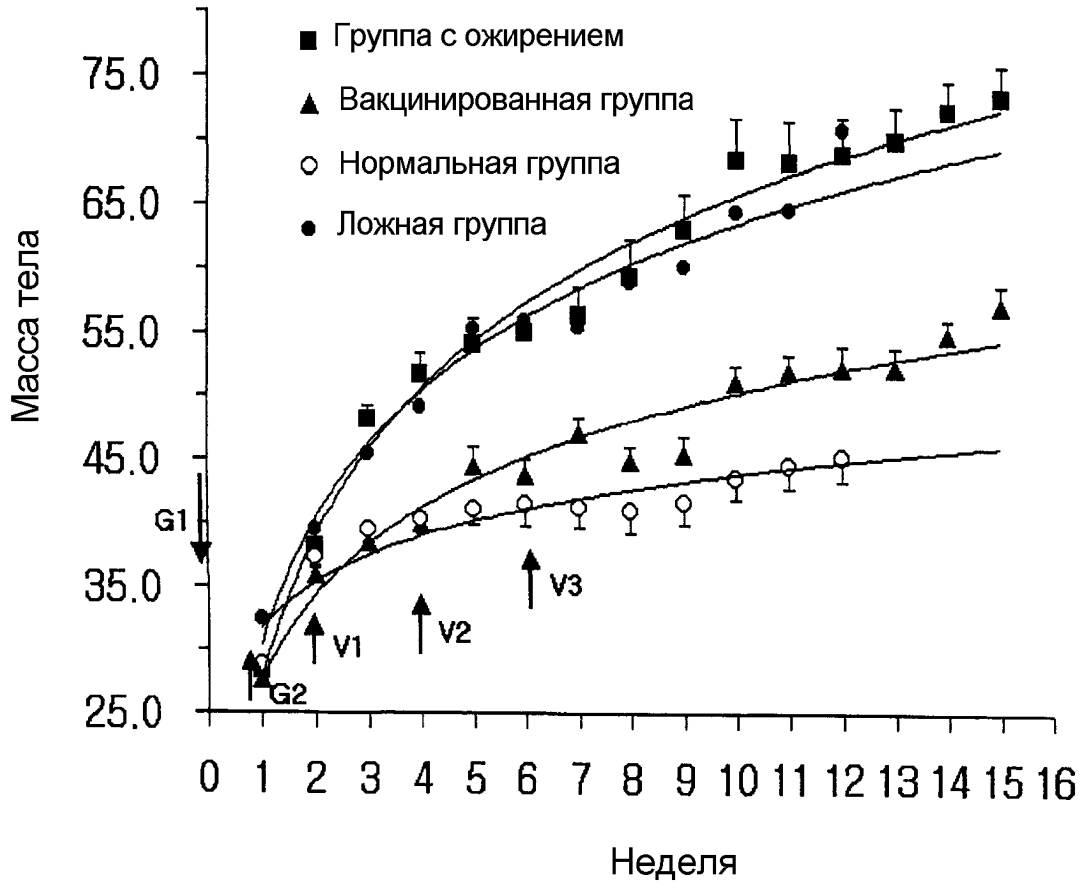
В.



ФИГ. 8



ФИГ. 9



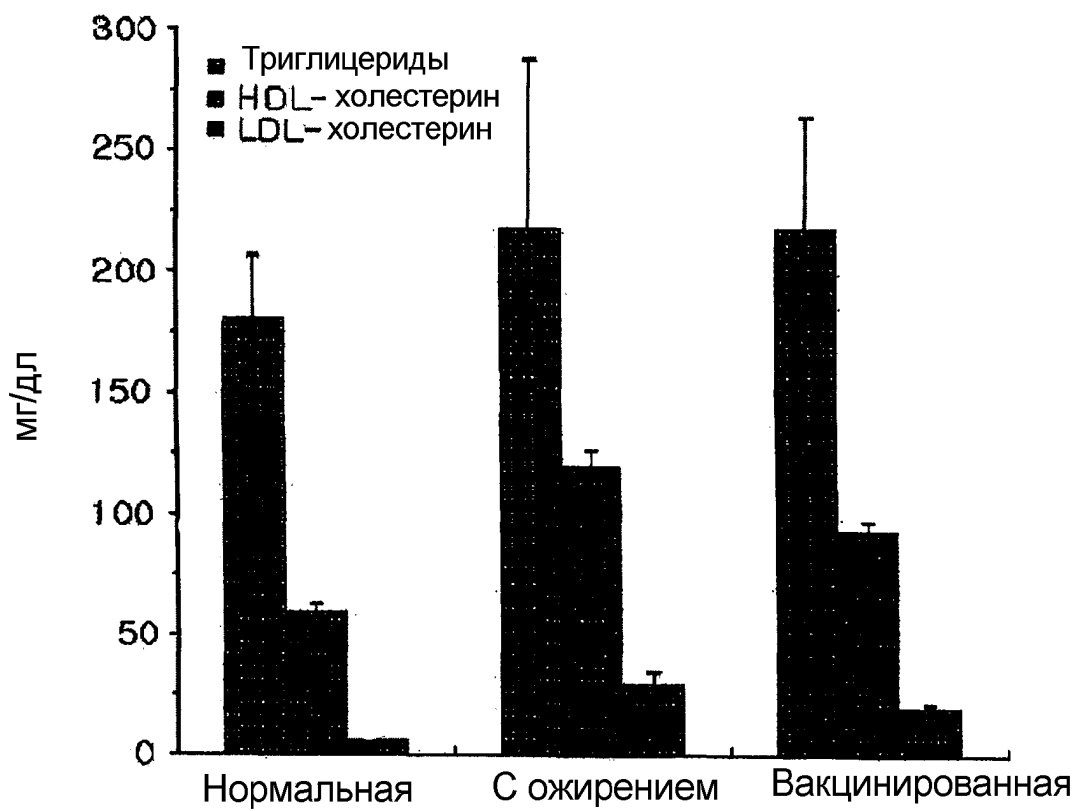
ФИГ. 10



ФИГ. 11а



ФИГ. 11b



ФИГ. 12