

(19)



(10) **LT IP835 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **IP835**

(51) Int. Cl. (2006): **A61K 39/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 08 03**

A61K 47/48

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 02 27**

A61P 31/00

A61P 35/00

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

C07K 14/195

C12N 15/09

C12N 15/62

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **902871, 1990 06 26, NO**

PCT/NO91/00093, 1991 06 26, NO

(71) Pareiškėjas:

Forskningssiftelsen Det Norske RadiumHospital, Montebello, N-0310 Oslo 3, NO

(72) Išradėjas:

Sjur OLSNES, NO

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, J.Jasinskio g. 16A, LT-01112 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Peptido įvedimo į citozolį būdas

(57) Referatas:

—

A6IK 39/385, CI2N I5/62
A6IK 47/48, C07K I3/00

PEPTIDO ĮVEDIMO Į CITOZOLĮ BŪDAS

Šis išradimas skirtas peptido įvedimo į citozolį būdai, o konkrečiau - naujam vakcinų prieš virusus, viduląstelinius parazitus ir bakterijas bei piktybines ląsteles gamybos principui.

Antigeno pateikimas (prezentacija) pagrindinio audinių sutai-
komumo komplekso (MHC) I klasės antigenais vaidina svarbų vaidmenį
apsaugant nuo patogeninių organizmų ir juos pašalinant. Citotoksi-
niai T limfocitai atpažįsta ląsteles, ekspresuojančias savo paviršiu-
je svetimus ar nebūdingus antigenus, ir jas suardo, o tai svarbu eli-
minuojant iš organizmo infekciją. Tas pats mechanizmas veikia ir ša-
linant piktybines ląsteles. Tam, kad MHC I klasės molekulės galėtų
pateikti antigeną, reikia, kad pastarasis būtų citozolyje arba ląs-
telės endoplazminiame tinkle (Germain, R.N. Nature 322, 687-689
(1986)). Todėl peptidai, pateikiami išoriškai, paprastai neiššaukia
I klasės atsako. Tačiau, jeigu antigenas dirbtinai įvedamas į citozo-
lį, tuomet MHC I klasės molekulės gali jį prezentuoti (Moore, M.W.,
Carbone, F.R. a. Bevan, M.J. Cell 54, 777-785 (1988)). Šiandien įp-
rasta imunizuoti prieš tokias struktūras panaudojant susilpnintus
(atenuotus) gyvus virusus, sugebančius patekti į ląstelę ir joje dau-
gintis. Tuomet tiksliniai peptidai pasigamina ląstelėse ir gali būti
prezentuoti pastarųjų paviršiuje. Tokiu būdu padidinama tinkamų ci-
totoksinių CD8⁺ ląstelių populiacija, ir vėliau susidūrus su atitin-
kamu virulentiniu viruso kamieniu, organizmas turi imuninę apsaugą.
Problemos, kurios iškyla naudojant šį būdą, dalinai susijusios su
tuo, kad kartais susilpnintas virusas gali vėl virsti virulentiniu,
o dažniausiai - dėl susilpninto viruso paruošimo galimybių. Todėl
patogūs ir nepažeidžiantys svetimų peptidų, tokių kaip virusiniai
antigenai, įvedimo į citozolį būdai gali būti naudingi gaminant vakci

nas tam, kad organizme būtų padidinta atitinkamų CD8⁺ su MHC I klasės antigenais susijusių citotoksinių T limfocitų populiacija.

Vieninteliai žinomi išorės baltymų, kurie gali įeiti į citozolį, pavyzdžiai yra tam tikri bakterijų ir augalų toksinai, kaip antai, dirterotoksinas, Pseudomonas aeruginosa egzotoksinas A, ricinas, abrinas, viskuminas, modeksinas, Shigela toksinas, cholerotoksinas, kokliušo toksinas (Olsnes, S. a. Sandvig, K. In: "Immunotoxins" (A.E. Frankel, ed.), Kluwer Academic Publishers, Boston 1988, pp. 39-73; Olsnes, S. a. Sandvig, K. In: "Receptor-mediated endocytosis" (I. Pastan a. M.C. Willingham, eds.), Plenum Publ. Corp., 1985, pp. 195-234). Šios grupės toksinai įeina į citozolį, kuriame vykdo fermentines reakcijas, žalingas ląstelei ar visam organizmui. Genų inžinierijos būdu galima sukonstruoti toksinų molekules, pasižyminčias ^{labai} mažu toksiškumu (Barbieri, J.T. a. Collier, R.J. Infect. Immun. 55, 1647-1651 (1987)). Jeigu toksinai galėtų įnešti į ląsteles papildomas peptidines medžiagas, tuomet tokie netoksiški mutantai galėtų būti naudingi vakcinų gamybai, įvedant į citozolį antigeninius peptidus (Cerundolo et al. Nature 345, 449 (1990)), kuriuos galėtų prezentuoti MHC I klasės antigenai. Tokias antigenines sekas galima išskirti iš daugelio virusų, bakterijų ir parazitų, o taip pat galima išskirti tokias struktūras ir iš tam tikrų piktybinių ląstelių.

Šio išradimo tikslas - sukurti antigeninių peptidų sekų translokacijos į citozolį saugiu būdu mechanizmą tam, kad padidėtų citotoksinių T limfocitų, gebančių sąveikauti su atitinkamu antigenu ir pašalinti tas ląsteles, kurios prezentuoja antigeninius peptidus. Nors paminėtų aukščiau skirtingų toksinų įėjimo mechanizmas iš esmės yra tas pats, sąlygos paruoštos detaliau dirterotoksino atvejui. Tai toksinas, kurį mes naudojome daugumoje mūsų tyrimų, susijusių su būdo panaudojimu.

VALDŽIOS ĮSTAIGA

Šiame darbe mes parodome, kad iš esmės netoksiškas difterotoksino mutantas gali translokuoti į citozolį prikabintus prie jo N-terminalinio galo oligopeptidus. Peptidai, kuriuos mes tyrėme, pakankamai skyrėsi savo sekomis, todėl galima padaryti išvadą, kad tuo pačiu būdu į ląsteles galima įvesti daug įvairių peptidų.

Taigi šis išradimas pasakoja apie peptido įvedimo į citozolį būdą, tam tikslui peptidą prijungiant prie bakterinio ar augalinio toksino arba prie mutanto. Be to, šis išradimas pasakoja apie vakcinės paruošimo būdą prijungiant peptidą prie bakterinio ar augalinio toksino, arba prie mutanto tam, kad peptidas būtų translokuotas į citozolį, ko pasekoje vėliau ląstelės paviršiuje jį galėtų prezentuoti (pateikti) MHC I klasės antigenai. Visa tai organizme iššauktų su I klase susijusį imuninį atsaką ir padidintų atitinkamą $CD8^+$ T limfocitų populiaciją. Be to, šis išradimas pasakoja apie vakcinas, kurias galima paruošti aukščiau paminėtu būdu ir panaudoti jas prieš virusus, viduląstelines bakterijas ir parazitus bei molekules, asocijuotas su piktybiniais susirgimais.

I. PAV. N-terminaliniai difterotoksino pailginimai.

A. Difterotoksino geno, nešancio trigubą mutaciją, keičiančią Glu^{I48} į Ser, koduojančiame rajone Gly^I pakeistas iniciatoriumi Met, patalpintu už T3 promotoriaus taip, kad gautųsi pBD-IS (McGill, S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (1989)). pB-B3-DI gautas suskaldant pBD-I NcoI pagalba ir įterpiant oligonukleotidą, koduojantį oligopeptidą MGVDEYNEMPMPVN, ir pažymėtą kaip B3. pGD-2 koduoja difterotoksina su jo natūralia signaline seka MSRKLFASILIGALLGIGAPPSAHA (žymima ss), išsidėsčiusia už SP6 promotoriaus. Plazmidė gauta pGD-I paveikus (McGill, S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (1989)). fermentais HindIII ir PstI, išsikišimai pašalinti S_I -nuklease ir viskas liguota, kad gautųsi pGD-2.

B. Genai transkribuoti in vitro ir gautos mRNRs transliuotos

triušio retikulocitų lizato sistemoje pridėjus $I^{35}SI$ metionino (McGill, S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (1989)). Transliacijos mišinys dializuotas per naktį prieš fosfatinio buferio fiziologinį tirpalą (PBS) (0,14 M NaCl, 10 mM Na-fosfato, pH 7.4) ir po to dar 4 val prieš Hepes terpę (Dulbeko modifikuota Iglo terpė, kurioje bikarbonatas pakeistas 20 mM Hepes, pH 7.4) tam, kad pasišalintų redukuojantys agentai ir susidarytų disulfidiniai tilteliai. Kiekvieno pavyzdžio mėginys analizuotas elektroforetiškai poliakrylamido gelyje su natrio dodecyl sulratu (SDS-PAGE) redukcinėmis sąlygomis (Olsnes, S. a. Eiklid, K. J.Biol. Chem. 255, 284-289 (1980)). Kai kuriais atvejais transliacijos produktas paveiktas protein A-Sefaroze (Pharmacia, Sweden), kuri prieš tai buvo inkubuota su triušio anti-B3 antiserumu (3 ir 4 takeliai) arba su anti-ricinu (5 takelis). Adsorbuota medžiaga analizuota SDS-PAGE. DT - transliacijos nuo pBD-I produktas; B3-DT - transliacijos nuo pB-B3-DI produktas; es-DT - transliacijos nuo pGD-2 produktas.

2 PAV. A-fragmento su prie N-galo prijungtu B3 oligopeptidu translokacija į citozolį. pBD-I ir pB-B3-DI transkribuoti ir transliuoti in vitro. Atitinkami transliacijos produktai (DT ir B3-DT) inkubuoti su Vero ląstelėmis, augančiomis vienu sluoksniu 24-duobučių mikrotitravimo plokštelėse, 24°C temperatūroje 20 min pridėjus 10 μ M monenzino (McGill, S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (1989)). Po inkubacijos ląstelės atplautos 2 kartus Hepes terpe ir paveiktos nuosekliai 0.4 g/ml TPCK (N-tozyl-L-fenyl-alanin chlorometyl ketonas), o po to tripsinu Hepes terpėje su 10 μ M monenzino (po 5 min 20°C). Po šio poveikio ląstelės atplautos Hepes terpe, pH 4.8, su 10 mM natrio gliukonato priedu, reikalingu tam, kad padidėtų terpės buferinė galia esant žemam pH, ir joje inkubuotos 2 min 37°C. Ląstelės atplautos Hepes terpe, pH 7.4, ir paveiktos 3 mg/ml pronaze Hepes terpėje, pH 7.4, turinčioje 10 μ M

monenzino 5 min 37°C. Atsikabinusios po poveikio nuo plokštelės paviršiaus ląstelės surinktos centrifuguojant ir dar kartą atplautos Hepes terpe, turinčia 1 mM NEM (N-etyl maleimidas) ir 1 mM PMSF (fenylmetilsulfonyl fluoridas). Kai kuriais atvejais (I-3 ir 8-10 takeliai) ląstelės lizuotos Tritonu-X-100 fosfatinio buferio fiziologiniame tirpale su 1 mM PMSF ir 1 mM NEM. Po to branduoliai pašalinti centrifuguojant ir 10% (W/v) trichloracto rūgštimi precipituotas supernatanto baltymas, arba jis imunoprecipituotas protein A-Sefarozės adsorbuotais anti-B3 antikūnais. Kitais atvejais (4-7 takeliai) ląstelės paveiktos 50 µg/ml saponinu fosfatinio buferio fiziologiniame tirpale, turinčiame 1 mM PMSF ir 1 mM NEM tam, kad išsilaivintų A-fragmentas. Po to baltymai, esantys nuosėdose ir supernatanto frakcijoje, precipituojami trichloracto rūgštimi. Visais atvejais išsodinta medžiaga analizuota SDS-PAGE (13.5% gelis) būdu neredukcinėse sąlygose.

3 PAV. Difterotoksino su signaline seka translokacija į citozolį. I-4 takeliai: ^{125}I -pažymėtas natūralus toksinas (wt-DT, I takelis) ir in vitro transliuotas pGD-2(^{35}S Metioninu pažymėtas toksinas su signaline seka, ss-DT) pririšti prie Vero ląstelių ir perskelti ant ląstelių (I ir 2 takeliai). 3 takelyje ląstelės paveiktos kaip 2 takelyje, išskyrus tai, kad panaudota 6 kartus daugiau transliacijos produkto ir ląstelės po to inkubuotos pH 4.8 sąlygomis ir paveiktos pronaze kaip aprašyta 2 pav. Ląstelės lizuotos Tritonu X-100 ir branduoliai pašalinti. Supernatantai inkubuoti su protein A-Sefaroze, kuri prieš tai buvo inkubuota su triušio anti-difterotoksino serumu. Adsorbuota medžiaga analizuota redukciniemis (I ir 2 takeliai) arba neredukciniemis (3 ir 4 takeliai) sąlygomis SDS-PAGE (10% gelis) būdu. 4 takelyje - pronaze paveiktos ląstelės, po to veiktos 50 µg/ml saponinu ir į terpę išsiskyrusi medžiaga analizuota tiesiogiai. 5-12 takeliai: transliacijos nuo pBD-I (DT) ir nuo pGD-2 (ss-DT) produktai pririšti prie Vero ląstelių, perskelti, in-

kubuoti pH 4.8 ir po to paveikti pronaze. Lizuotos ląstelės analizuotos neredukcinėmis sąlygomis SDS-PAGE (15% gelis) būdu tiesiogiai (5-8 takeliai) arba paveiktos saponinu, ir membraninės nuosėdos bei supernatantinė frakcija (atitinkamai 9 ir 10 bei II ir I2 takeliai) išanalizuota atskirai.

Corynebacterium diphtheriae patogeniniai kamienai sintetuoja difterotoksina kaip viengrądinį polipeptidą. Baltymas lengvai suskaldomas tripsinui jautrioje vietoje į 2 disulfidiniu tilteliu sujungtus fragmentus - A ir B (Pappenheimer, A.M., Jr. Annu. Rev. Biochem. 46, 69-94 (1977)).

B-fragmentas (37 kD) rišasi su ląstelės paviršiaus receptoriais, kai tuo tarpu A-fragmentas (21kD) veikia kaip fermentas, kuris, translokuotas į citozolį, inaktyvuoja elongacijos faktorių 2, pastarąjį ADF-ribozilindamas ir tokiu būdu blokuoja baltymų sintezę (Van Ness, B.G., Hovard, J.B. a. Bodley, J.W. J. Biol. Chem. 255, 10710-10716 (1980)). Translokaciją, kuri normaliomis sąlygomis vyksta per endosomų ribojančias membranas, iššaukia žemas pH, esantis rūgščiose pūslelėse. (Draper, R.K. a. Simon, M.I. J. Cell Biol. 87, 849-854 (1980); Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Cell Biol. 87, 828-832 (1980)). Kuomet ląstelės, su prie jų paviršiaus prisijungusiu toksinu, susiduria su rūgščia terpe, translokacija vyksta nuo ląstelės paviršiaus į jos vidų (Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 256, 9068-9076 (1981)). Pateiktuose pavyzdžiuose mes naudojome šią dirbtinę sistemą, kadangi ji įgalina atskirti translokuotą medžiagą nuo netranslokuotos (Moskaug, J.Ø., Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 262, 10339-10345 (1987); Moskaug, J.Ø., Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 263, 2518-2525 (1988)).

Tam, kad būtų išvengta difterotoksino vektoriaus toksinio poveikio ląstelei, panaudotas mutantinis toksinas, turintis trigubą mutaciją, pakeičiančią GLU¹⁴⁸, esantį fermentiškai aktyvioje toksino

molekulės vietoje, į SER (Barbieri, J.T. a. Collier, R. J. Infect. Immun. 55, I647-I65I (I987)). Taip modifikuotas toksinas pasižymi žymiai sumažėjusiu toksiškumu.

Pavyzdžiai

Mes naudojome muatvūsusio toksino geno 2 variantus: vieną be (pBD-I) (McGill, S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (I989)), o kitą - su (pGD-2) natūralia 25 amino-rūgščių signaline seka (IA Pav.). Vienu atveju svetimas oligopeptidas, pažymėtas B3, buvo prijungtas prie toksino N-terminalinio galo tam, kad būtų suformuota plazmidė pB-B3-DI.

Sukonstruoti dariniai patalpinti už T3 arba SP6 RNR-polimerazės promotoriaus ir transkribuoti bei transliuoti in vitro (McGill S., Stenmark, H., Sandvig, K. a. Olsnes, S.: EMBO J. 8, 2843-2848 (I989)). Kiekvienu atveju buvo aptinkama pagrindinė juosta, atitinkanti pilno ilgio baltymą, ir tik nedideli žemesnės molekulinės masės medžiagos pėdsakai (IB Pav.). Toksinas su signaline seka (7 takelis) arba su B3 (I takelis) migravo, kaip ir tikėtasi, truputį lėčiau nei pats toksinas (2 ir 6 takeliai). Be to, toksiną su B3 selektyviai precipitavo anti-B3 (4 takelis), bet ne kontrolinis serumas (5 takelis). Anti-B3 neprecipitavo toksino be B3.

Dializuoti transliacijos produktai pririšti prie Vero ląstelių, perskelti ant ląstelių žemos koncentracijos tripsinu, o ląstelės po to inkubuotos pH 4.8. Šiose sąlygose dalis pririšto toksino buvo translokuota (pernešta) į citozolį ir todėl tapo apsaugota nuo pridėtos į terpę pronazės poveikio (Moskaug, J.Ø., Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 263, 25I8-2525 (I988)). Difterotoksino atveju panaudojus šias sąlygas buvo apsaugoti du fragmentai (2I kD ir 25 kD), atitinkantys visą A-fragmentą (2I kD) ir dalį B-fragmento (25 kD iš totalinių 37 kD). Patekus molekulėms į citozolį, tarp-fragmentiniai disulfidiniai tilteliai buvo redukuoti (Moskaug, J.Ø.,

Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 262, I0339-I0345 (I987)).

I pavyzdys

Atliekant eksperimentą su toksinu, turinčiu B3, pagrindiniai fragmentai (25 kD ir 22.5 kD) buvo apsaugoti pridėjus nedidelį kiekį 2I kD fragmento (2 takelis). Pastarasis matomai yra A-fragmentas, nuo kurio nuskeltas B3. Fragmentai nebuvo apsaugoti, jeigu nebūda-vo inkubuojama žemame pH (3 takelis). Anti-B3 serumas precipitavo 22.5 kD fragmentą (9 takelis), o preimuninis serumas to nedarė (10 takelis). Anti-B3 serumas neprecipitavo apsaugoto A-fragmento be oligopeptido (8 takelis). Matomai didesnis kiekis apsaugoto A-fragmento su B3 yra dėl didesnio įsijungusio radioaktyvumo kiekio, kadangi B3 turi 3 metioninus, o pats A-fragmentas - 5.

Kuomet ląstelės su translokuotu difterotoksiniu paveikiamos saponino žemomis koncentracijomis, leidžiančiomis citoplazmos markeriams fermentams išeiti iš ląstelės nesufirpdant membranų, translokuotas A-fragmentas išsilaisvina į terpę, o tuo tarpu iš B-fragmento-kilęs 25 kD polipeptidas lieka susijęs su membranine frakcija (Moskaug, J.Ø., Sandvig, K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 263, 2518-2525 (I988); Moskaug, J.Ø., Sandvig K. a. Olsnes, S. J. Biol. Chem. 264, II367-II372 (I989)). Tai rodo, kad translokuotas A-fragmentas yra laisvoje būklėje citozolyje, o tuo tarpu 25 kD polipeptidas yra įterptas membranoje. Taip pat dauguma A-fragmentų, turinčių B3, po poveikio saponinu išsilaisvino į terpę tokiu pat būdu kaip ir normalus A-fragmentas (6 takelis), kai tuo tarpu 25 kD fragmentas liko susijęs su membranomis (4 ir 5 takeliai). Todėl visa tai rodo, kad difterotoksinas sugeba translokuoti B3 (I4 aminorūgščių) į citozolį.

2 pavyzdys

Tam, kad išbandytume didesnio oligopeptido translokacijos galimybę, pasirinkome toksiną, turintį savo normalią signalinę seką

(25 aminorūgštys). Kaip parodyta 3 Pav., 2 takelyje, tripsinas perskėlė šį baltymą į 23.5 kD A-fragmentą ir 37 kD B-fragmentą (Šiame bandyme toksinas buvo perskeltas tik dalinai. Dalinai perskeltas I^{25} I-pažymėtas natūralus toksinas palyginimui parodytas I takelyje). Kuomet toksinas su signaline seka buvo prijungtas prie ląstelių, perskeltas ir po to inkubuotas pH 4.8, du fragmentai (23.5 kD ir 25 kD) buvo apsaugoti nuo pronazės poveikio (8 takelis). Apsaugotas A-fragmentas su neatskelta signaline seka parodytas taip pat 3 takelyje, kur medžiagą precipitavo anti-difterotoksino serumas, galintis jungtis su visu toksinu, A-fragmentu, lygiai taip kaip ir su visu B-fragmentu (žiūr. I ir 2 takelius), bet ne su 25 kD-fragmentu. Kuomet pronaze-paveiktos ląstelės buvo veiktos saponinu, pailgintas A-fragmentas išsilaisvino į terpę (4 ir I2 takeliai), o tuo tarpu 25 kD fragmentas pasiliko membraninėje frakcijoje (I0 takelis).

I š r a d i m o a p i b r ė ž t i s

1. Peptido įvedimo į ląstelės citozolį būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ląstelės yra sąlytyje su bakteriniu ar augalinio holotoksino arba mutantu, sujungtu su minėtu peptidu ir galinčiu translokuoti (pernešti) šį peptidą į citozolį.
2. Vakcinos paruošimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prie bakterinio ar augalinio holotoksino arba mutanto prijungiamas peptidas tam, kad pastarasis būtų perneštas į citozolį ir po to šį peptidą ląstelės paviršiuje prezentuotą (pateiktą) MHC I klasės antigenai, iššaukdami su I klase susijusį imuninį atsaką, padidinantį organizme atitinkamų CD8⁺ T limfocitų populiaciją.
3. Būdas pagal I ar 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas bakterinio ar augalinio holotoksino mutantas, sukonstruotas tokiu būdu, kad prarastų savo toksiškumą, neprarasdamas sugebėjimo įeiti į citozolį ir įnešti papildomą peptidą į citozolį.
4. Būdas pagal bet kurį iš I-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas netoksinis difterijos holotoksino mutantas arba kitas giminingas holotoksinas toks, kaip ricinas, abrinas, modeksinas, viskuminas, volkenzinas, Pseudomonas aeruginosa egzotoksinas A, Shigella toksinas, juodligės toksinas, cholerotoksinas, E. coli karščiui jautrus toksinas arba kokliušo toksinas.
5. Būdas pagal bet kurį iš I-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas netoksinis difterijos holotoksino mutantas.
6. Vakcina, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad gali būti paruošta pagal būdą, nurodytą 2-5 punktuose.
7. Vakcinos, nurodytos 6 punkte, panaudojimas prieš virusus,

[Vakcinos, nurodytos 6 punkte, panaudojimas prieš virusus, 10, 11]

vidulastelines bakterijas ir parazitus bei prieš molekules, susijusias su piktybiniais navikais.

8. Junginys, įvedantis peptidą į citozolį, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas bakterinis ar augalinis holotoksinas arba mutantas, sujungtas su minėtu peptidu ir galintis translokuoti minėtą peptidą į citozolį.

9. Junginys, nurodytas 8 punkte, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad naudojamas netoksinis difterijos holotoksino mutantas ar giminingas holotoksinas toks, kaip ricinas, abrinas, modeksinas, viskuminas, volkenzinas, Pseudomonas aeruginosa egzotoksinas A, Shigella toksinas, juodligės toksinas, cholerotoksinas, E. coli karščiui jautrus toksinas arba kokliušo toksinas.

1/3

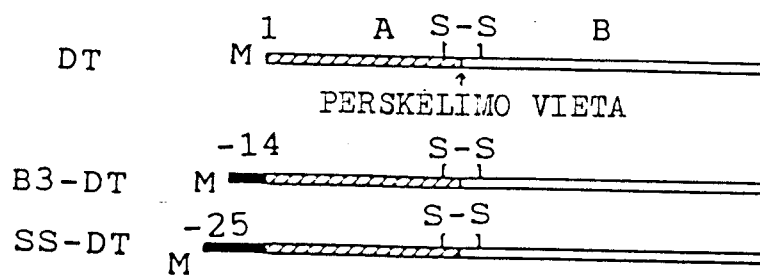
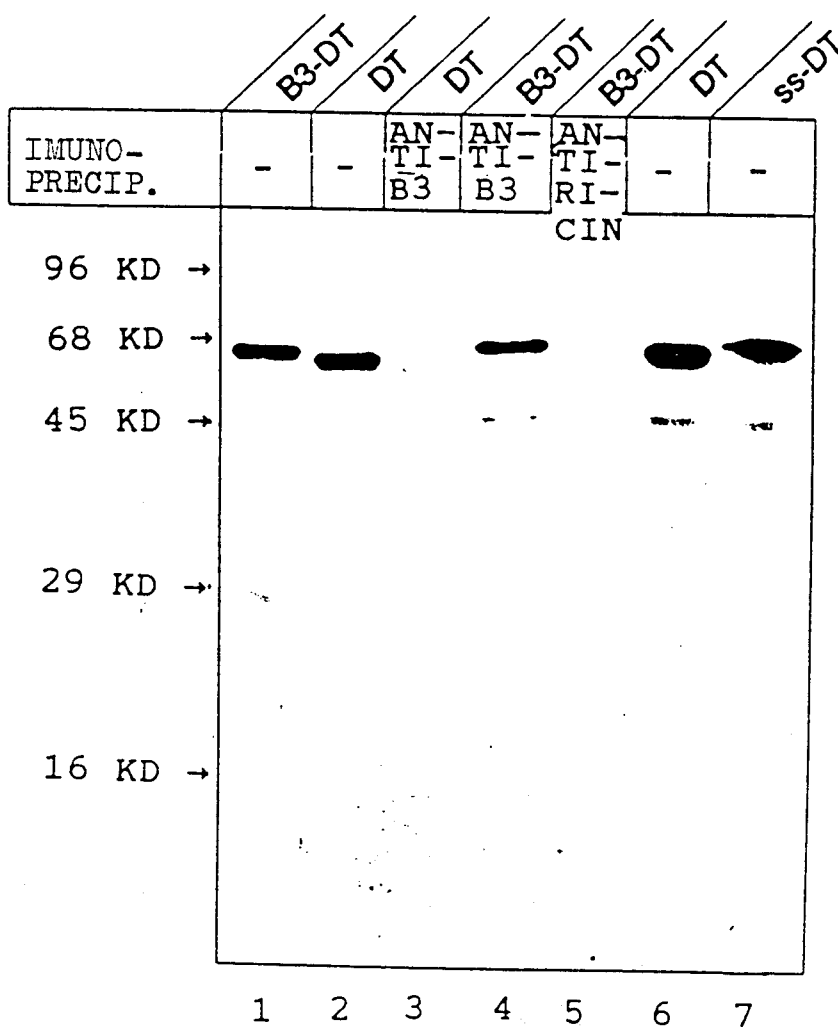
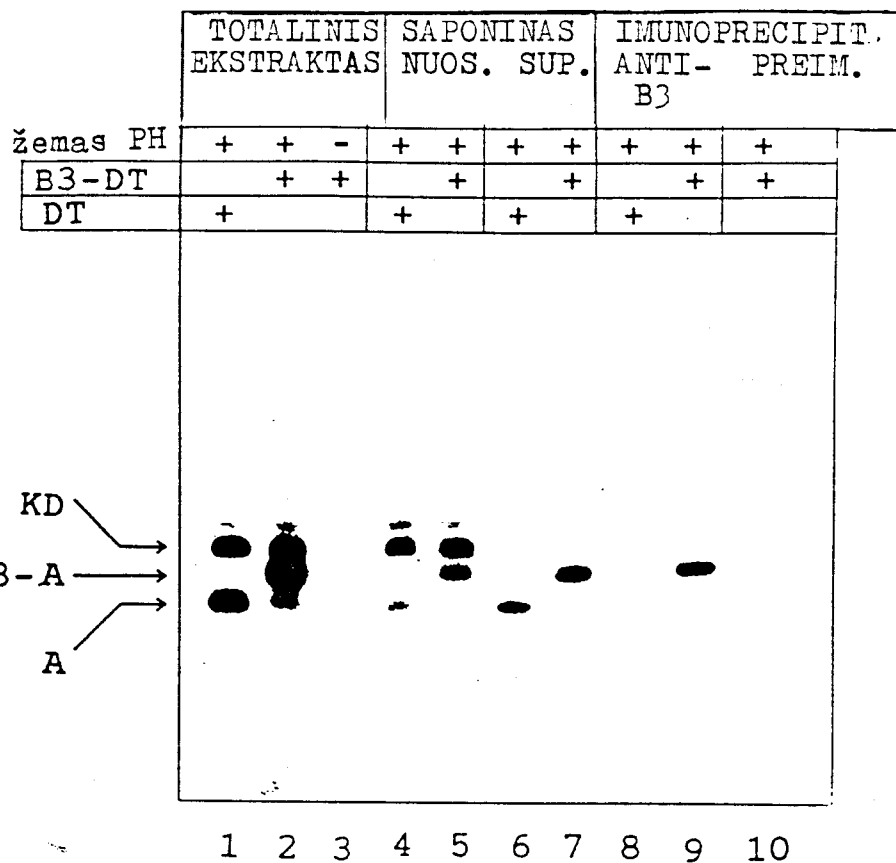


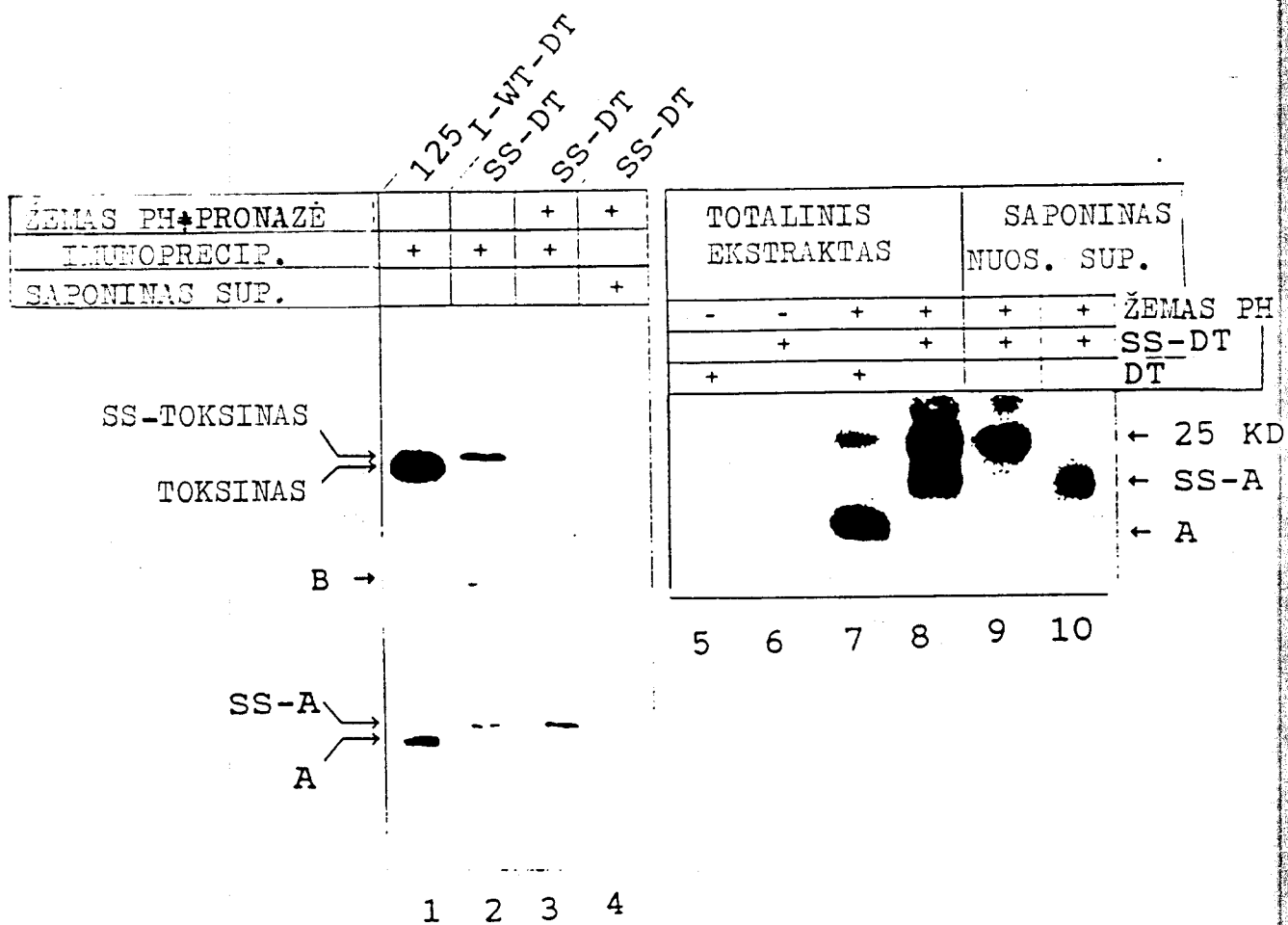
FIG. 1 A
I A PAV.



I B PAV.



2 PAV.



3 PAV.