



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85527 (13) C2

(51) МПК (2009)

G01N 33/53

A61K 38/04

A61K 39/395

A61P 13/08 (2006.01)

A61P 35/04 (2008.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18

C12N 1/19

C12N 5/10

C12N 15/09

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО АБО ФРАГМЕНТ АНТИТІЛА, ЩО СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЮТЬСЯ З ФРАГМЕНТОМ ПОЛІПЕПТИДУ RG1, ІМУНОКОН'ЮГАТ, ЯКИЙ ВКЛЮЧАЄ ВИДІЛЕНЕ АНТИТІЛО АБО ФРАГМЕНТ АНТИТІЛА, СПОСОБИ ВИБІРКОВОГО РУЙНУВАННЯ КЛІТИНИ, ЛІКУВАННЯ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ, ДІАГНОСТИКИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЙОГО МЕТАСТАЗІВ У ПАЦІЄНТА, ЗАСТОСУВАННЯ АНТИТІЛА ТА ІМУНОКОН'ЮГАТА ЯК ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

1

2

(21) 2002075749

(22) 15.12.2000

(24) 10.02.2009

(86) PCT/US00/33901, 15.12.2000

(31) 09/732,357

(32) 07.12.2000

(33) US

(31) 60/172,370

(32) 16.12.1999

(33) US

(46) 10.02.2009, Бюл.№ 3, 2009 р.

(72) ХАРКІНС РІЧАРД, ПАРКЕС ДЕБОРА, ПЕРРІ
ГОРДОН, ШНАЙДЕР ДУГЛАС В., ШТЕЙНБРЕХЕР
РЕНАТЕ, DE/US

(73) ШЕРІНГ АКЦІОНГЕЗЕЛЬШАФТ

(56) MANDA RYOKUHEI ET AL: "Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display." GENOMICS, vol. 61, no. 1, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 5-14.

HIGASHIJIMA S-I ET AL: "MINDIN/F-SPONDIN FAMILY: NOVEL ECM PROTEINS EXPRESSED IN THE ZEBRAFISH EMBRYONIC AXIS" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 192, no. 2, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 211-227.

WO A 9845442, 15.10.1998.

WO A 9850073, 12.11.1998.

WO A 9946281, 16.09.1999.

US A 5871969, 16.02.1999.

(57) 1. Виділене антитіло або фрагмент антитіла, що специфічно зв'язуються з фрагментом поліпептиду RG1, вибраним із групи, яка складається з:

(а) біологічно або імунологічно активного фрагменту поліпептиду, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає частині, але не всій амінокислотній послідовності, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2);

(б) фрагменту поліпептиду, який складається з амінокислот 28-46 послідовності, представленої на Фіг.2; та

(в) фрагменту поліпептиду, який складається з амінокислот 77-91 послідовності, представленої на Фіг.2.

2. Антитіло за п.1, де антитіло специфічно зв'язується з амінокислотою послідовністю PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8).

3. Антитіло за п.1, де антитіло специфічно зв'язується з амінокислотою послідовністю HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10).

4. Антитіло за п.1, де антитіло являє собою поліклональне антитіло.

5. Антитіло за п.1, де антитіло являє собою моноклональне антитіло.

6. Антитіло за п.1, де антитіло являє собою людське антитіло.

7. Імунокон'югат, який включає виділене антитіло або фрагмент антитіла, що специфічно зв'язуються з фрагментом поліпептиду RG1, вибраним із групи, яка складається з:

(а) біологічно або імунологічно активного фрагменту поліпептиду, що має амінокислотну послідов-

(13) C2

(11) 85527

(19) UA

ність, яка відповідає частині, але не всій амінокислотній послідовності, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2);

(б) фрагменту поліпептиду, який складається з амінокислот 28-46 послідовності, представленої на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2); та

(в) фрагменту поліпептиду, який складається з амінокислот 77-91 послідовності, представленої на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2);

кон'югованого з терапевтичним агентом.

8. Імунокон'югат за п.7, де терапевтичний агент являє собою радіоізотоп, вибраний з групи, що включає ¹¹¹In, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁴⁸Sc, ⁷²Ga, ⁷³Ga, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹¹Bi, ²¹²Bi, ²¹³Bi та ²¹⁴Bi.

9. Імунокон'югат за п.7, де терапевтичний агент являє собою цитотоксичний агент.

10. Імунокон'югат за п.9, де цитотоксичний агент вибирають із групи, яка включає ризин, доксорубіцин, даунорубіцин, таксол, бромід етидію, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, дигідроксіантрацидін, актиноміцин D, дифтерійний токсин, екзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин, глюкокортикоїди та радіоактивні ізотопи.

11. Імунокон'югат за п.7, де фрагменти антитіла вибирають із групи, яка включає Fv, F(ab')- і F(ab')₂-фрагменти.

12. Спосіб вибіркового руйнування клітини, яка експресує поліпептид, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), який включає взаємодію імунокон'югата за п.7 із клітиною таким чином, що терапевтичний агент імунокон'югата може руйнувати клітину.

13. Спосіб лікування раку передміхурової залози, який передбачає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості імунокон'югата за п.8 або 9.

14. Спосіб діагностики раку передміхурової залози у пацієнта за допомогою вимірювання надекспресії RG1, який включає:

(а) одержання у пацієнта зразка тканини передміхурової залози;

(б) контактування зразка з антитілом або фрагментом антитіла за будь-яким з пп.1-6;

(в) виявлення зв'язування антитіла або фрагмента антитіла з фрагментом поліпептиду RG1 людини в зразку і

(г) виявлення, чи підвищений рівень зв'язування у зразку, в порівнянні з рівнем, виявленим в контролях норми.

15. Спосіб діагностики метастазів у пацієнта з раком передміхурової залози, за допомогою вимірювання надекспресії RG1, який включає:

(а) одержання у пацієнта зразка тканини, яка не є тканиною передміхурової залози, та/або рідини з організму;

(б) контактування зразка з антитілом або фрагментом антитіла за будь-яким з пп.1-6;

(в) виявлення в зразку зв'язування антитіла або фрагмента антитіла з фрагментом поліпептиду RG1 людини і

(г) виявлення, чи підвищений рівень зв'язування у зразку, в порівнянні з рівнем, виявленим в контролях норми.

16. Спосіб за п.15, де антитіло або фрагмент антитіла мітять сполукою, вибраною з групи, яка включає радіоактивну мітку, фермент, хромофор і флуоресціюючий агент, для того, щоб безпосередньо або опосередковано викликати сигнал, який може бути виявлений.

17. Спосіб діагностики метастазів у пацієнта з раком передміхурової залози, за допомогою вимірювання надекспресії RG1, який включає:

(а) введення пацієнту антитіла або фрагмента антитіла за будь-яким з пп.1-6, де антитіло або фрагмент антитіла є радіоактивно міченим;

(б) виявлення за допомогою імуноцитинграфії зв'язування вказаного радіоактивно міченого антитіла або фрагмента антитіла з фрагментом поліпептиду RG1 людини і

(в) виявлення, чи підвищений цей рівень зв'язування у зразку, в порівнянні з рівнем, виявленим в нормальному контролі.

18. Спосіб за будь-яким з пунктів 14, 15 або 17, де антитіло або фрагмент антитіла специфічно зв'язується з амінокислотною послідовністю PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8).

19. Спосіб за будь-яким з пунктів 14, 15 або 17, де антитіло або фрагмент антитіла специфічно зв'язується з амінокислотною послідовністю HSSDYSMWKRNQYVS (SEQ ID NO: 10).

20. Спосіб за будь-яким з пунктів 14, 15 або 17, де антитіло являє собою поліклональне антитіло.

21. Спосіб за будь-яким з пунктів 14, 15 або 17, де антитіло являє собою моноклональне антитіло.

22. Спосіб за будь-яким з пунктів 14, 15 або 17, де фрагмент антитіла являє собою F(ab')₂-фрагмент.

23. Спосіб за п.17, де радіоактивною міткою є In-111 або Tc-99m.

24. Антитіло за пп.1, 2, 3, 4, 5 або 6 для застосування як лікарського засобу.

25. Імунокон'югат за п.7, 8, 9, 10 або 11 для застосування як лікарського засобу.

Даний винахід претендує на ефект попередньої заявки на патент [US №60/172370, поданої 16 грудня 1999р.], яка повністю включена в даний опис як посилання.

Винахід стосується, зокрема, нових поліпептидів і поліпептидів; варіантів та похідних поліпептидів і поліпептидів; способів одержання поліпептидів і поліпептидів та їх варіантів і похідних; антитіл до поліпептидів, їх варіантів і

похідних; і застосування поліпептидів, поліпептидів, варіантів, похідних та антитіл. Зокрема, згідно із цим та іншими об'єктами винахід стосується нових поліпептидів людського позаклітинного матриксу (який позначений як RG1), поліпептидів, які кодують ці поліпептиди, антитіл до цих поліпептидів і антисмислових поліпептидів, які блокують експресію RG1.

Рак передміхурової залози представляє собою захворювання, яке часто зустрічається в чоловіків, яке виявляють приблизно в одній третині чоловіків старше 45 років. Є дані, що причина захворювання може мати як генетичну основу, так і обумовлюватися факторами, пов'язаними з навколишнім середовищем, причому, у більшості випадків захворювання, імовірно, є результатом обох причин. Вивчення сімейного раку дозволило припустити, що генетична схильність відіграє роль приблизно в 5-10% всіх хворих, що страждають від раку передміхурової залози, і приблизно в 45% чоловіків молодше 55 років.

Є докази того, що рак передміхурової залози розвивається у вигляді хвороби, яка включає декілька стадій, причому одним з ранніх порушень є простатична інтраепітеліальна неоплазія (ПІН). Ранні стадії хвороби залежать від андрогену, а пізні стадії не залежать від гормонів. Проліферативне захворювання передміхурової залози, відоме як доброякісна гіперплазія, часто виявляють у клінічних умовах, але воно, імовірно, не є однією зі стадій розвитку раку. Однак воно часто пов'язано з раком передміхурової залози. Рак передміхурової залози часто є багатолокусним, як правило, він повільно розвивається і є гетерогенним. На пізніх стадіях раку часто утворюються метастази в лімфатичних вузлах і кістковій тканині.

Рак передміхурової залози, як правило, діагностують при фізичному обстеженні і за рівнями у сироватці антигену передміхурової залози (PSA). При локалізованій хворобі як лікування використовують радикальну простатектомію. Лікування розвиненого метастатичного захворювання в даний час здійснюють шляхом видалення з організму андрогену за допомогою орхієктомії або лікування з використанням GnRF (гонадопротин-релізінг-фактор) або за допомогою антиандрогенної терапії. Однак розвинене захворювання практично завжди стає стійким до дії гормонів, і воно не піддається лікуванню. Крім того, відомі серйозні побічні впливи, пов'язані як з радикальною простатектомією, так і з лікуванням, заснованим на видаленні з організму андрогену. Вони включають високий ризик виникнення інконтиненції й імпотенції, пов'язаних з радикальною простатектомією, і переломи кісток і остеопороз, пов'язані з лікуванням, заснованим на видаленні з організму андрогену.

Таким чином, існує велика потреба в розвитку нових терапевтичних підходів до лікування раку передміхурової залози як на ранніх, так і на пізніх стадіях розвитку. Також існує необхідність у розробці нових діагностичних агентів, зокрема агентів, які дозволяють розрізняти стадії хвороби, оскільки це в значній мірі визначає вибір лікування. Наприклад, якщо хвороба поширюється за межі передміхурової залози і метастазує у лімфатичні вузли, то радикальна простатектомія не показана, оскільки вона впливає на розвиток хвороби, але може привести до серйозних небажаних побічних дій. Агент, за допомогою якого можна знайти метастази *in vivo*, має дуже важливе значення. При раку передміхурової залози виявлені зміни експресії специфічних протеїнів, включаючи аномальну експресію p53 на останній стадії раку передміхурової залози, знижені рівні рецепторів TGF- β , знижені рівні E-кадгерину, C-Sam (молекула клітинної адгезії) і деяких інтегринів. Експресія онкогену bc1-2 різко підвищується на останній стадії розвитку незалежних від андрогену пухлин, і прогноз для пацієнтів, у яких експресуються підвищені рівні bc1-2, є дуже поганим. У той час як вказані вище зміни експресії генів добре описані в багатьох публікаціях, не були виявлені ніякі зміни експресії, які є причиною захворювання. Звідси впливає важливість ідентифікації нових протеїнів, експресія яких пов'язана з присутністю або розвитком пухлин передміхурової залози, які можуть служити як молекулярні мішені для діагностики та терапії раку передміхурової залози.

У даному описі представлений новий гомолог суперсімейства протеїнів позаклітинного матриксу. Цей гомолог, а саме RG1, експресується в тканині передміхурової залози, і в пухлинах передміхурової залози може спостерігатися його понад експресія.

Позаклітинний матрикс представляє собою складну сітку колагену і еластину, занурену у в'язкопружну основу, яка складається з протеогліканів і глікопротеїнів. Матрикс представляє собою тривимірний підтримуючий каркас, який розділяє тканинні компартменти, опосередковує з'єднання клітин і визначає архітектуру тканини [Bissel і ін., *J. Theor. Biol.*, 99: 31-68, 1982; Carlson і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2403-2406, 1981]. Матрикс діє подібно до макромолекулярного фільтру [Hay E.D., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, Plenum Press, 1982], а також впливає на диференціювання, мітогенез і морфогенез клітин [Gospodarowicz D., *Cancer Res.*, 38: 4155-4171, 1978]. Біохімічні взаємодії між нормальними клітинами і матриксом при неоплазії можуть змінюватися і це може впливати на проліферацію пухлини. Пухлинні клітини можуть взаємодіяти з матриксом різними шляхами. По-перше, пухлинні клітини можуть прикріплюватися до матриксу за допомогою специфічних для плазмової мембрани рецепторів [Terranova і ін., *Cancer Res.*, 42: 2265-2269, 1982]. По-друге, каскадом ферментів, які властиві пухлинній клітині і хазяїну, опосередковується розкладання матриксу [Eisen і ін., *Bioch. Biophys. Acta*, 151: 637-645, 1968]. У третій, у диференційованих ділянках пухлин пухлинні клітини можуть синтезувати і накопичувати матрикс або індукувати у клітин-хазяїнів здатність накопичувати надлишковий матрикс [Brownstein і ін., *Cancer*, 40: 2979-2986, 1977].

RG1 має гомологію із суперсімейством протеїнів позаклітинного матриксу, що кодується генами Mindin/F-spondin (Міндин/Ф-спондин). Загальним для сімейства генів є наявність двох консервативних доменів спондину, тобто FS1 і FS2, біля N-кінця і принаймні одного повтору тромбоспондину типу 1 (TSR1) на C-кінці [Shimeld S.M., *Mol. Biol. Evol.*, 15(9): 1218-1223, 1998]. TSR-мотив вперше був виявлений у протеїнах позаклітинного матриксу хребетних [Bornstein P., *J. Cell Biol.*, 130: 503-506, 1995], а потім був виявлений у деяких інших протеїнах позаклітинного матриксу. Існує ряд до-

казів того, що TSR опосередковують клітинну адгезію і відіграють вирішальну роль у генезі пухлин. Наприклад, було встановлено, що протеолітичні фрагменти тромбоспондину, які містять TSR, і синтетичні пептиди, які мають послідовності, що відповідають ділянці TSR тромбоспондину, підсилюють адгезію і метастазування пухлинних клітин [Prater і ін., J. Cell Biol., 112: 1031-1040, 1991; Tuszyński і Nicosia, BioEssays, 18: 71-76, 1996], мають антиангіогенну активність [Tolsma і ін., J. Cell Biol., 122: 497-511, 1993] і інгібують агрегацію тромбоцитів і метастазування меланом [Tuszyński і ін., J. Cell Biol., 116: 209-217, 1992].

До даного часу виявлені представники цього суперсімейства, які включають ген *Caenorhabditis elegans*, один ген *Drosophila* і багато генів хребетних. У *C. elegans* ген F.10E7.4 кодує 5 TSR крім FS1- і FS2-доменів [Higashijima і ін., Dev. Biol., 192: 211-227, 1997]. У *Drosophila* представник сімейства, який позначений як М-спондин (*mspo*), містить FS1- і Р82-домени й один TSR [Umeyiwa і ін., Dev. Biol., 186: 165-176, 1997]. Ген М-спондину кодує секретований протеїн, локалізований у місцях прикріплення м'язів і, імовірно, виконує функцію протеїну позаклітинного матриксу, який підтримує з'єднання м'яз-аподема. Представники сімейства, виявлені в хребетних, включають гени, виділені зі смугастої перцини (Міндин1 і Міндин2, F-спондин1 і Р-спондин2), щурячий F-спондин, F-спондин Хепорус і щурячий Міндин. Міндин1 і Міндин2 дуже подібні і мають генну структуру, аналогічну до гена М-спондину *Drosophila*. Гени Міндин1 і Міндин2 обидва кодують один TSR крім FS1- і FS2-доменів [Higashijima і ін., Dev. Biol., 192: 211-227, 1997]. Усі гени, такі як F-спондин1 і Р-спондин2 смугастої перцини, щурячий F-спондин [Klar і ін., Cell, 69: 95-110, 1992] і F-спондин Хепорус [Altaba і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8268-8272, 1992], мають подібну структуру, кодують 6 копій TSR крім FS1- і FS2-доменів. У хребетних тварин суперсімейство Міндин/F-спондин можна розділити на 2 групи: гени, які мають значну подібність з вихідними щурячими генами F-спондину і Міндину, і гени, які мають значну подібність з геном М-спондину *Drosophila*. У хребетних як гени Міндину, так і гени F-спондину, кодують протеїни, які головним чином експресуються вентральною пластинкою нервової трубки в процесі ембріонального розвитку.

В даний час один ген, споріднений до гена F-спондину, тобто AmphiF-спондин, був виділений з ланцетника *Amphioxus* [Shimeld S.M., Mol. Biol. Evol., 15(9): 1218-1223, 1998]. На основі молекулярних філогенетичних даних встановлено, що AmphiF-спондин є близьким аналогом певної підгрупи генів типу F-спондину хребетних, які кодують шість TSR. AmphiF-спондин кодує три TSR і два повтори фібронектину типу III, один із яких у значній мірі ідентичний до повтору фібронектину типу III з Deleted in Colorectal Cancer (DCC). Експресія протеїну виявлена в більшій частині центральної нервової системи і не обмежена середньою лінією, як це відомо для протеїнів Міндину і F-спондину хребетних.

Ці дані дозволяють припустити, що протеїни позаклітинного матриксу, такі як новий протеїн

RG1, які є гомологом суперсімейства Міндину/F-спондину, можуть виявитися перспективними агентами для діагностики раку і терапевтичного втручання.

Даний винахід стосується унікальної поліпептидної послідовності, яка кодує новий протеїн, позначений як RG1. Поліпептиди RG1 мають гомологію з щурячим протеїном позаклітинного матриксу міндином. Він містить гідрофобну сигнальну послідовність на N-кінці, два домени спондину (FS1- і FS2) і повтор тромбоспондину типу 1 на C-кінці. RG1 на 89,7% аналогічний до щурячого міндину. Поліпептидна послідовність, позначена в даному описі як rg1, і представлена на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1), кодує амінокислотну послідовність RG1, яка наведена на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Таким чином, об'єктом даного винаходу є поліпептиди, які, серед іншого, ідентифіковані як нові протеїни, які мають гомологію із сімейством протеїнів позаклітинного матриксу типу міндин, що підтверджено порівняльним аналізом амінокислотної послідовності, наведеної на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2) і відомих амінокислотних послідовностей інших протеїнів позаклітинного матриксу.

Ще одним об'єктом винаходу є поліпептиди, які кодують такі поліпептиди, зокрема, поліпептиди, які кодують поліпептид, позначений у контексті даного опису як RG1.

Відповідно до цього об'єкта винахід стосується виділених поліпептидів, які кодують RG1, включаючи мРНК, кДНК, а також у додаткових варіантах цього об'єкта їх варіантів, аналогів або похідних, включаючи їх фрагменти, включаючи фрагменти варіантів, аналогів і похідних, які мають цінні біологічні, діагностичні, клінічні або терапевтичні властивості.

Особливо переважними варіантами цього об'єкта є алейні варіанти поліпептидів, які зустрічаються в природних умовах, які кодують варіанти поліпептиду, позначеного в контексті даного опису як RG1.

Таким чином, об'єктом винаходу є нові людські поліпептиди, позначені в контексті даного опису як RG1, а також їх варіанти і похідні, включаючи варіанти і похідні фрагментів, та їх аналоги, придатні з біологічної, діагностичної або терапевтичної точок зору.

Одним з найбільш переважних варіантів цього об'єкта винаходу є варіанти RG1, які кодуються алейними варіантами поліпептиду rg1, які зустрічаються в природних умовах.

Ще одним об'єктом винаходу є спосіб одержання вищевказаних поліпептидів, фрагментів поліпептидів, варіантів і похідних, фрагментів варіантів і похідних і їх аналогів. Відповідно до переважного варіанту цього об'єкта винахід стосується способів одержання вищевказаних пептидів RG1, який передбачає культивування клітин-хазяїнів, які мають здатність експресувати включений у них поліпептид екзогенного походження, що кодує RG1, в умовах, призначених для експресії людського RG1 у хазяїні, і потім виділення експресованого поліпептиду.

Наступним об'єктом винаходу є продукти, композиції, процеси і методи, за допомогою яких ви-

щевказані поліпептиди і полінуклеотиди застосовують серед іншого для дослідницьких, біологічних, клінічних і терапевтичних цілей.

Певними переважними варіантами цього об'єкта винаходи є продукти, композиції, процеси і методи, призначені серед іншого для оцінки експресії RG1 у клітинах шляхом виявлення поліпептидів RG1 або мРНК, яка кодує RG1; і оцінки генетичних варіацій і аномалій, таких як дефекти, у генах *rg1*.

Певними переважними варіантами цього й іншого об'єктів є зонди, які гібридизуються з послідовностями *rg1*.

І ще одним об'єктом винаходу є антитіла, які мають високу селективність у відношенні поліпептидів RG1 або їх фрагментів і які можна застосовувати в методі діагностики і/або виявлення експресії RG1, яка може бути пов'язана з раком передміхурової залози. Відповідно до певних переважних варіантів цього об'єкта винаходу антитіла мітять таким чином, щоб одержати сигнал, який можна виявити. Особливо переважними є антитіла, мічені за допомогою радіоактивного ізотопу, ферменту, хромофору або флуоресціюючого агента.

І ще одним об'єктом винаходу є антитіла, кон'юговані з терапевтичним агентом, з метою введення в клітини *in vitro*, у клітини *ex vivo* і в клітини *in vivo* або в багатоклітинний організм. У цьому плані особливо переважними є терапевтичні агенти, які мають цитотоксичну дію. Відповідно до певних переважних варіантів такі кон'юговані антитіла вводять хворим людям для лікування хворобливого стану, для якого характерна активність або експресія RG1, такого як рак передміхурової залози.

І ще одним об'єктом винаходу є пептиди і антидіотипічні антитіла, які можна застосовувати для стимулювання імунної відповіді.

Наступним об'єктом винаходу є рибозими і полінуклеотиди, комплементарні до полінуклеотидів *rg1* (тобто антисмислові полінуклеотиди), призначені для введення в клітини *in vitro*, у клітини *ex vivo* і в клітини *in vivo* або в багатоклітинний організм. У цьому плані особливо переважним є введення хворим людям антисмислових молекул з метою лікування хворобливого стану, такого як рак передміхурової залози або доброякісна гіперплазія передміхурової залози, що полегшується при зниженні рівня активності RG1.

Інші об'єкти, особливості, переваги й аспекти даного винаходу стануть очевидними фахівцям у даній галузі з наведеного нижче опису. Однак слід розуміти, що наведене нижче опис і конкретні приклади, у яких представлені переважні варіанти здійснення винаходу, представлені лише з метою ілюстрації. Без обмеження суті й обсягу винаходи можуть бути внесені різні зміни і модифікації, які стануть очевидні фахівцям у даній галузі після ознайомлення з наведеним нижче описом та іншими розділами винаходу.

Фіг.1: Полінуклеотидна послідовність *rg1* (SEQ ID NO: 1), яка кодує біологічно або імунологічно активну форму RG1.

Фіг.2: Виведена амінокислотна послідовність RG1 (SEQ ID NO: 2) з доменами F-спондину (підкреслені простою лінією) і доменом тромбоспондину (підкреслений подвійною лінією)

Фіг.3: Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей RG1 і щурячого міндину. Послідовність RG1 наведена зверху.

Фіг.4: Полінуклеотидна і виведена амінокислотна послідовності RG1.

Фіг.5: Експресія мРНК *rg1* у тканинах людини, оцінена за допомогою ПЛР на основі Taqman-методу. З тканин людини, як пухлинних, так і здорових, виділяли РНК стандартними методами. Праймери і зонд для виявлення експресії мРНК *rg1* конструювали за допомогою програми Perkin Elmer's Primer Express і синтезували за допомогою Synthetic Genetics. мРНК *rg* була виявлена в тканинах передміхурової залози людини. Істотно більш низький рівень експресії мРНК *rg* виявлений в інших тканинах, наприклад, печінки.

Фіг.6: Очищення нативного протеїну RG1, який секретується клітинами лінії LNCaP. Для виявлення нативного протеїну RG1, який секретується клітинами лінії LNCaP, здійснювали аналіз методом Вестерн-блотингу з використанням антисироватки, одержаної шляхом імунізації синтетичною пептидною послідовністю RG1 (3C, SEQ ID NO: 10; див. приклад 4). На кресленні представлені фракції, елюйовані при здійсненні хроматографії на Q-сефарозі концентрованого кондиціонованого середовища для клітин лінії LNCaP: (L) - завантаження стовпчика, (F) - розганання в колонці, (1-12) - фракції, елюйовані за допомогою сольового градієнта. Передбачена молекулярна маса RG1 складає ~36кД, однак встановлено, що для протеїну RG1, експресія якого відбувалася в бактеріальних клітинах, у BHK (клітини нирки дитинчати хом'яка) і в клітинах лінії LNCaP, у всіх випадках міграція на ПААГ відповідала ~45кДа (L, фракції 6-9).

Фіг.7: Імуногістохімічне фарбування з метою виявлення експресії RG1 у тканинах передміхурової залози людини. Тканину передміхурової залози одержували з відділення урології медичної школи Стенфордського університету (Urology Department at Stanford University School of Medicine). Фарбування здійснювали за допомогою набору Vector ABC-AP (AK5002). Візуалізацію фарбування здійснювали за допомогою набору Vector Red substrate (SK-5100), а контрастне фарбування проводили за допомогою гематоксиліну. Результати свідчать про виражене фарбування перилумінальної мембрани в залозистих утвореннях.

Визначення

В описі, прикладах і наведеній формулі винаходу, якщо не вказане інше, наступні поняття мають вказані нижче значення:

Поняття "RG1" означає поліпептид, який має амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2); його варіанти, аналоги, похідні і фрагменти і фрагменти варіантів, аналогів і похідних. Поняття «фрагмент», «похідне» і «аналог» стосовно поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), означають поліпептид, який у значній мірі зберігає біологічну і/або імунологічну

активність, яка властива поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Поняття "rg1" позначає полінуклеотид, який має послідовність, представлену на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1), і полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, що мають амінокислотну послідовність RG1, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2); і полінуклеотиди, які кодують варіанти, аналоги, похідні і фрагменти RG1 і фрагменти варіантів, аналогів і похідних. Поняття "rg1" також означає полінуклеотиди, які включають РНК, а також полінуклеотиди, комплементарні до полінуклеотидів, які кодують поліпептидну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Поняття "полінуклеотид(и)" у цілому стосується будь-якого полірибонуклеотиду або полідезоксирибонуклеотиду, який може представляти собою немодифіковану РНК або ДНК або модифіковану РНК або ДНК. Так, наприклад, у контексті даного опису поняття полінуклеотид означає серед іншого одно- і дволанцюгову ДНК, ДНК, яка представляє собою суміш одно- і дволанцюгових ділянок, одно- і дволанцюгову РНК і РНК, яка представляє собою суміш одно- і дволанцюгових ділянок, гібридні молекули, які включають ДНК і РНК, які можуть бути одноланцюговими або більш часто двухланцюговими або представляють собою суміш одно- і дволанцюгових ділянок. Крім того в контексті даного опису полінуклеотиди означають триланцюгові ділянки, які містять РНК або ДНК або і РНК і ДНК. У таких ділянках ланцюги можуть складатися з тих самих молекул або з різних молекул. Ділянки можуть включати всі, тобто одну або декілька молекул, однак звичайно ділянка включає лише декілька молекул. Одна з молекул триспиральної ділянки часто представляє собою олігонуклеотид.

У контексті даного опису поняття "полінуклеотид" включає ДНК або РНК, як описано вище, які містять одну або декілька модифікованих основ. Так, під вказане поняття "полінуклеотиди" підпадають ДНК і РНК, каркаси яких модифіковані з метою надання стабільності або з інших причин. Крім того, під поняття "полінуклеотиди" підпадають ДНК і РНК, які включають незвичайні основи, такі як інозин, або модифіковані основи, такі як мічені за допомогою тритію основи, причому, два вказані приклади не обмежують обсяг винаходу.

Мається на увазі, що в ДНК і РНК можна вводити широку різноманітність модифікацій, відомих фахівцям у даній галузі, з метою надання їм цінних властивостей. У контексті даного опису під поняття "полінуклеотид" підпадають такі хімічно, ферментативно або метаболічно модифіковані форми полінуклеотидів, а також хімічні форми ДНК і РНК, характерні для вірусів і клітин, включаючи серед іншого прості та складні клітини.

Поняття "поліпептиди" у контексті даного опису включає всі описані нижче поліпептиди. Основна структура поліпептидів добре відома в даній галузі й описана в дуже великій кількості підручників та інших публікацій. У цьому контексті використовуване в даному описі поняття стосується будь-якого пептиду або протеїну, які містять 2 або більше амінокислот, з'єднаних одна з одною у вигляді лінійного ланцюга за допомогою пептидних зв'яз-

ків. У контексті даного опису поняття стосується як поліпептидів з коротким ланцюгом, які звичайно в даній галузі називають, наприклад, пептидами, олігопептидами й олігомерами, так і поліпептидів з більш довгим ланцюгом, що, як правило, у даній галузі називають протеїнами і які включають багато типів.

Мається на увазі, що поліпептиди часто включають амінокислоти, відмінні від 20 амінокислот, які звичайно позначаються як 20 амінокислот, що зустрічаються в природних умовах, і що багато амінокислот у даному поліпептиді, включаючи кінцеві амінокислоти, можна модифікувати або за допомогою природних процесів, таких як глікозилювання та інші посттрансляційні модифікації, або за допомогою методів хімічної модифікації, добре відомих у даній галузі. Навіть звичайні модифікації, які відбуваються в поліпептидах у природних умовах, є занадто численними, для того щоб перерахувати їх повністю у даному описі, але вони докладно описані в основних підручниках і в більш докладних монографіях, також у великій науковій літературі й добре відомі фахівцям у даній галузі. Серед відомих модифікацій, які можуть бути присутнім у поліпептидах за даним винаходом, з метою ілюстрації можна вказати деякі, у тому числі ацетилювання, ацилювання, АДФ-рибозилування, амідування, ковалентне приєднання флавіну, ковалентне приєднання фрагмента гем, ковалентне приєднання полінуклеотиду або похідного полінуклеотиду, ковалентне приєднання ліпиду або похідного ліпиду, ковалентне приєднання фосфотидилінозитолу, поперечне зв'язування, циклізацію, утворення дисульфідного містка, деметилювання, утворення ковалентних поперечних зв'язків утворення цистину, утворення піроглутамату, формілювання, гамма-карбоксилування, глікування, глікозилювання, утворення GPI-якоря, гідроксилування, йодинування, метилювання, міристоїлювання, окислення, протеолітичний процесінг, фосфорилування, пренілювання, рацемізацію, селеноїлювання, сульфування, опосередковане транспортною РНК додавання амінокислот до протеїнів, таке як аргінілювання та убікитинування.

Такі модифікації добре відомі фахівцям у даній галузі і докладно описані в науковій літературі. Деякі найбільш розповсюджені модифікації, такі як глікозилювання, приєднання ліпідів, сульфування, гамма-карбоксилування залишків глутамінової кислоти, гідроксилування й АТФ-рибозилування, описані, наприклад, у великій кількості відомих підручників, наприклад, у [I.E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2-е вид., W.H. Freeman and Company, New York, 1993]. Цьому предмету присвячені багато великих оглядів, такі, наприклад, як представлені [Wold F. у: *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, ред. B. C. Johnson, Academic Press, New York, стор.1-12, 1983; Seifter і ін., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 і Rattan і ін., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992].

Як це добре відомо і вказано вище, мається на увазі, що поліпептиди не завжди є повністю лінійними. Наприклад, поліпептиди можуть бути розга-

луженими в результаті убікитинізації, і вони можуть бути кільцевими і мати розгалуження, як правило в результаті посттрансляційних процесів, включаючи випадки процесінгу, які зустрічаються в природних умовах, і випадки, які є результатом маніпуляцій людини, що не відбуваються в природних умовах, або не мати розгалужень. Кільцеві, розгалужені і розгалужені кільцеві поліпептиди можуть бути синтезовані за допомогою нетрансляційних процесів, які зустрічаються в природних умовах, а також тільки шляхом синтезу.

Модифікації можуть стосуватися будь-якої ділянки поліпептиду, включаючи каркас пептиду, амінокислотні бокові ланцюги і N- або C-кінці. Як правило блокада в поліпептиді аміно- або карбоксильної групи або обох цих груп шляхом ковалентних модифікацій є звичайною для поліпептидів, які зустрічаються в природних умовах, і синтетичних поліпептидів, і такі модифікації можуть також бути присутніми у поліпептидах за даним винаходом. Наприклад, амінокінцевий залишок поліпептидів, одержаних в Е. сої, до протеолітичного процесінгу майже завжди представляє собою N-формілметіонін.

Модифікації, які можуть мати місце в поліпептиді, часто залежать від того, яким чином він одержаний. Для поліпептидів, одержаних, наприклад, у результаті експресії клонованого гена в хазяїні, природа та ступінь модифікацій значно визначаються здатністю клітини-хазяїна до посттрансляційної модифікації і наявністю сигналів модифікації в амінокислотній послідовності поліпептиду. Наприклад, як добре відомо, глікозилювання часто не відбувається в бактеріях-хазяїнах, таких як Е. сої. Таким чином, коли потрібно глікозилювання, поліпептид необхідно експресувати у хазяїні, для якого характерно глікозилювання, як правило, у еукаріотичній клітині. У клітинах комах часто відбуваються такі ж посттрансляційні процеси глікозилювання, що й у клітинах ссавців, і з цієї причини були розроблені системи експресії, на основі клітин комах, які застосовували для ефективної експресії протеїнів ссавців, які мають серед іншого природні схеми глікозилювання. Аналогічні розуміння застосовні до інших модифікацій.

Мається на увазі, що той самий тип модифікації може бути присутнім у такому же або в іншому ступені в декількох ділянках даного поліпептиду. Крім того, даний поліпептид може включати багато типів модифікацій.

У цілому, у контексті даного опису поняття поліпептид включає всі такі модифікації, зокрема модифікації, які присутні в поліпептидах, синтезованих шляхом експресії поліпептиду в клітині-хазяїні.

Поняття "поліпептид, який кодує поліпептид" у контексті даного опису включає поліпептиди, які містять послідовність, що кодує поліпептид за даним винаходом, зокрема поліпептид RG1, який має амінокислотну послідовність, наведену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2). Поняття включає поліпептиди, які містять одну безперервну ділянку або переривчасті ділянки, які кодують поліпептид (наприклад, перервані інтронами), у сполученні з іншими ділянками.

Поняття "біологічно активний" стосується структурних, регуляторних або біохімічних функцій поліпептиду RG1, який зустрічається в природних умовах.

Поняття "імунологічна активність" означає здатність RG1, який зустрічається в природних умовах, рекомбінантного або синтетичного RG1 або будь-якого його фрагмента викликати специфічну імунну відповідь у відповідних тварин або у клітинах і зв'язуватися зі специфічними антитілами.

Поняття "олігонуклеотид(и)" стосується відносно коротких поліпептидів. Часто поняття стосується одностанцюгових дезоксирибонуклеотидів, але воно також може стосуватися як одно-, так і двостанцюгових рибонуклеотидів, гібридів РНК:ДНК і серед іншого до двостанцюгових ДНК. Олігонуклеотиди, такі як олігонуклеотидні зонди, які представляють собою одностанцюгову ДНК, часто синтезують хімічними методами, наприклад, за допомогою автоматичних синтезаторів олігонуклеотидів. Однак олігонуклеотиди також можна одержувати за допомогою різноманітних інших методів, включаючи методи *in vitro*, засновані на застосуванні рекомбінантної ДНК, і за допомогою експресії ДНК у клітинах і організмах. Поняття "олігонуклеотиди" або "олігомери" або поліпептидний "фрагмент", "ділянка" або "сегмент" стосуються поліпептидної послідовності, яка складається принаймні з 10 нуклеотидів і максимум приблизно з 60 нуклеотидів, переважно приблизно з 15-30 нуклеотидів і найбільш переважно приблизно з 20-25 нуклеотидів.

Поняття "RG1, який зустрічається в природних умовах" стосується RG1, який продукується людськими клітинами, які не були одержані за допомогою генетичної інженерії, і включає різні форми RG1, які утворилися в результаті посттрансляційних модифікацій поліпептиду, включаючи (але не обмежуючись ними) ацетилювання, карбоксилювання, глікозилювання, фосфорилювання, приєднання ліпідів (ліпідацию), ацилювання і розщеплення.

Поняття "варіант(и)" поліпептидів або поліпептидів у контексті даного опису означає поліпептиди або поліпептиди, які відрізняються від поліпептиду або поліпептиду, з яким проводиться порівняння (еталонного) відповідно. Такі варіанти описані більш детально нижче й в інших розділах даного опису.

(1) Поліпептид, який відрізняється за нуклеотидною послідовністю від іншого еталонного поліпептиду. Як правило, відмінності обмежені тим, що еталонна поліпептидна послідовність і послідовність варіанта дуже схожі в цілому й у багатьох ділянках ідентичні.

Як буде описано нижче, заміни в поліпептидній послідовності варіанта можуть бути мовчазними. Це означає, що вони можуть не змінювати амінокислотні послідовності, які кодуються поліпептидом. Якщо зміни обмежені мовчазними замінами, то варіант цього типу може кодувати поліпептид з такою ж амінокислотною послідовністю, що еталонний поліпептид. Як буде описано нижче, заміни в поліпептидній послідовності варіанта

можуть змінювати амінокислотну послідовність поліпептиду, яка кодується еталонним поліпептидом. Такі заміни в поліпептиді можуть привести до амінокислотних замін, додавання, делецій, злиття і зрізання у поліпептиді, який кодується еталонним поліпептидом, що буде пояснено нижче.

(2) Поліпептид, який відрізняється за амінокислотною послідовністю від іншого еталонного поліпептиду. Як правило, відмінності обмежені тим, що еталонні послідовності і варіант дуже схожі в цілому й у багатьох ділянках ідентичні. Варіант і еталонний поліпептид можуть відрізнятися наявністю в амінокислотній послідовності однієї або декількох замін, додавань, делецій, злиттів і зрізань, які можуть бути присутніми у будь-якій комбінації. Рекombінантні варіанти, які кодують однакові або аналогічні поліпептиди, можуть бути одержані за допомогою синтезу або відібрані на основі "надмірності" (виродженості) генетичного коду. Різні заміни кодонів, такі як мовчазні заміни, які утворюють різні сайти рестрикції, можна вводити з метою оптимізації клонування в плазмідному або вірусному векторі або експресії в конкретній прокариотичній або еукаріотичній системі. Також можна створювати мутації з метою зміни властивостей поліпептиду, зміни афінностей відносно зв'язування лігандів, міжкланцюгових афінностей або деградації поліпептиду, або інтенсивності кругообігу.

Поняття "алельний варіант" означає альтернативну форму поліпептиду rg1. Алелі утворюються в результаті мутації, тобто зміни поліпептидної послідовності, і звичайно продукують змінені мРНК або поліпептиди, структура або функція яких може бути змінена або не змінена. Будь-який конкретний ген може не мати взагалі, мати одну або декілька алельних форм. Загальні зумовлені мутаціями зміни, які приводять до одержання алелей, звичайно пов'язують із делеціями, додаваннями або замінами нуклеотидів, які зустрічаються в природних умовах. Кожний з цих типів змін може зустрічатися окремо або в сполученні один з одним, один або декілька разів у даній послідовності.

Поняття "похідне" стосується поліпептидів або поліпептидів, виведених із rg1 або RG1, які зустрічаються в природних умовах відповідно, шляхом хімічних модифікацій, таких як убіквінізація, введення мітки (наприклад, з використанням радіоактивних ізотопів, різних ферментативних модифікацій), ПЕГилування (дериватизація за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ)) або шляхом інсерції або заміни амінокислот, таких як орнітин (або заміни нуклеотидів, які кодують такі амінокислоти), які в нормі не зустрічаються в людських протеїнах.

Поняття "делеція" означає зміну або поліпептидної, або амінокислотної послідовностей, у результаті якої відбувається видалення одного або декількох поліпептидів або амінокислотних залишків відповідно.

Поняття "інсерція" або "додавання" означає зміну або поліпептидної, або амінокислотної послідовностей, що приводить до додавання одного або декількох поліпептидів або амінокислот-

них залишків відповідно в порівнянні з поліпептидною або амінокислотною послідовністю, яка зустрічається в природних умовах.

"Заміна" приводить до заміщення одного або декількох поліпептидів або амінокислотних залишків іншими поліпептидами або амінокислотами відповідно.

Переважаючі амінокислотні заміни представляють собою результат заміни однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, яка має аналогічні структурні і/або хімічні властивості, наприклад, заміни лейцину на ізолейцин або валін, аспартату на глутамат, або треоніну на серин, тобто представляють собою консервативні заміни амінокислот. Інсерції або делеції, як правило, стосуються приблизно 1-5 амінокислот. Допустимість варіації можна визначити експериментально шляхом систематичного здійснення інсерції, делеції або замін амінокислот у поліпептиді за допомогою методів рекombінантної ДНК і аналізу активності одержаних рекombінантних варіантів.

Поняття "фрагмент" означає поліпептид, який має амінокислотну послідовність, яка повністю відповідає частині, але не всій амінокислотній послідовності вказаних поліпептидів RG1 і їх варіантів або похідних.

Поліпептидний "фрагмент", "частина" або "сегмент" складається з послідовних амінокислотних залишків принаймні приблизно 5 амінокислот, часто принаймні приблизно 7 амінокислот, як правило принаймні приблизно 9-13 амінокислот, і в різних варіантах принаймні приблизно 17 або більше амінокислот.

Поняття "рекombінант" або "рекombінантна молекула ДНК" стосується поліпептидної послідовності, яка не зустрічається в природних умовах або одержана шляхом штучної комбінації двох сегментів послідовності, які мають різне походження. Під поняттям "одержаний рекombінантним шляхом" мають на увазі штучну комбінацію, часто здійснювану або за допомогою хімічного синтезу, або за допомогою штучного маніпулювання виділеними сегментами поліпептидів, наприклад, із застосуванням методів генетичної інженерії. Таке маніпулювання звичайно здійснюють для заміни кодона "надлишковим" (виродженим) кодоном, який кодує цю ж або консервативну амінокислоту, як правило, вводячи або видаляючи при цьому сайт розпізнавання послідовності. В альтернативному варіанті його здійснюють для з'єднання разом поліпептидних сегментів з необхідними функціями з одержанням єдиного генетичного елемента, який має необхідну комбінацію функцій, яка не зустрічається в звичайних природних формах. Таким шляхом можна включати сайти, які розпізнаються рестриктазами, регуляторні послідовності, які контролюють послідовності або інші важливі елементи. Поняття "рекombінантні молекули ДНК" включає клоновані і експресійні вектори. Поняття "рекombінант" також може означати поліпептид, який кодує поліпептид і який одержаний за допомогою методів рекombінантної ДНК.

Поняття "виділений" означає змінений за допомогою людини відносно свого природного стану, тобто, якщо він зустрічається в природних умовах,

то він змінений або видалений із природного оточення або і змінений і видалений. Наприклад, полінуклеотид або поліпептид, який зустрічається в природних умовах, у природних умовах, присутній у живому організмі в його природному стані, не є "виділеним" у тому розумінні, у якому використовується це поняття в контексті даного опису. Наприклад, у відношенні полінуклеотидів поняття "виділений" означає, що він виділений із хромосоми і клітини, в якій він зустрічається в природних умовах.

Полінуклеотиди і поліпептиди можуть знаходитися в складі композиції, такої як композиція в середовищах, у розчинах для інтродукції полінуклеотидів або поліпептидів, наприклад, у клітини, композицій або розчинів для хімічних або ферментативних реакцій, які, наприклад, не є композиціями, що зустрічаються в природних умовах, і при цьому вони підпадають під поняття виділені полінуклеотиди і поліпептиди в тому розумінні, у якому використовується це поняття в контексті даного опису.

Поняття "практично очищений" і "практично гомогенний" використовуються взаємозамінно і стосуються поліпептиду RG1, його фрагментів або полінуклеотидного сегменту, який їх кодує, коли такий поліпептид або полінуклеотид відділяють від компонентів, з якими він зв'язаний у природних умовах. Поліпептид RG1 або його фрагмент, або сегмент ДНК, який їх кодує, є практично очищеними від зв'язаних з ними в природних умовах компонентів, коли вони відділені від природних забруднювачів, які їх супроводжують у природному стані. Так, поліпептид, синтезований хімічним шляхом або синтезований у клітинній системі, відмінний від клітини, у якій він присутній у природі, повинен практично не містити компонентів, зв'язаних з ним у природних умовах. Аналогічно до цього, полінуклеотид, синтезований хімічним шляхом або синтезований у клітинній системі, відмінний від клітини, у якій він присутній у природі, повинен практично не містити компонентів, зв'язаних з ним у природних умовах.

"Гомологічний" при описуванні полінуклеотиду означає, що в двох полінуклеотидів або послідовностей, які їх характеризують, при їх оптимальному вирівнюванні і порівнянні з урахуванням відповідних нуклеотидних інсерції або делеції ідентичними є принаймні 70% нуклеотидів, як правило, приблизно 75-99% і більш переважно приблизно принаймні 98-99% нуклеотидів.

"Ступінь аналогічності" при описуванні поліпептиду визначають шляхом порівняння амінокислотної послідовності і консервативних амінокислотних замін поліпептиду з послідовністю другого поліпептиду.

Поняття "полімеразна ланцюгова реакція" або "ПЛР" стосується процедури, при якій певні ділянки ДНК ампліфікують відповідно до методики, описаної в [патенті США 4683195, виданому 28 липня 1987р.]. Як правило, необхідно мати інформацію про послідовність кінців поліпептидного фрагмента, який представляє інтерес, або безпосередньо за ними, на основі чого можна сконструювати олігонуклеотидні праймери; ці праймери повинні бути

орієнтовані назустріч один одному і повинні бути ідентичні або аналогічні до послідовності протилежних ланцюгів матриці, яка підлягає ампліфікації. 5'-кінцеві нуклеотиди двох праймерів повинні відповідати кінцям ампліфікованого продукту. ПЛР можна застосовувати для ампліфікації певних послідовностей ДНК із загальної геномної ДНК, кДНК, транскрибованої із загальної клітинної РНК, послідовностей плазмід і т.д. [див. загальні положення в Mullis і ін., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987; Erlich ред., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989].

Під поняттям "строгість" звичайно мають на увазі, що температура реакції знаходиться в діапазоні від приблизно $t_{\text{пл}} - 5^{\circ}\text{C}$ (температура на 5°C нижче за температуру плавлення ($t_{\text{пл}}$) зонда) до температури приблизно на $20-25^{\circ}\text{C}$ нижче $t_{\text{пл}}$. Фактично в даній галузі повинне бути очевидно, що найбільш строгу гібридизацію можна використовувати для ідентифікації або виявлення ідентичних полінуклеотидних послідовностей або для ідентифікації або виявлення аналогічних або споріднених полінуклеотидних послідовностей. У контексті даного опису поняття "строгість умови" означає, що гібридизація повинна відбуватися лише при наявності принаймні 95%-ної або переважно принаймні 97%-ної ідентичності між послідовностями.

Поняття "гібридизація" у контексті даного опису може стосуватися "будь-якого процесу за допомогою якого полінуклеотидний ланцюг з'єднується з комплементарним ланцюгом за допомогою спарювання основ" [Coombs J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, N.Y., 1994].

Поняття "терапевтично ефективна доза" означає таку кількість поліпептиду або антитілу до нього, його антагоністів або інгібіторів, включаючи антисмислові молекули і рибозими, що полегшує симптоми або стани хвороби. Терапевтичну активність і токсичність таких субстанцій можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних процедур у клітинних культурах або з використанням експериментальних тварин з визначенням, наприклад, значень ED_{50} (доза, яка має терапевтичну ефективність відносно 50% популяції) і LD_{50} (доза, летальна для 50% популяції). Співвідношення між дозами, які мають терапевтичну і токсичну дію, представляє собою терапевтичний індекс, і його можна виражати у вигляді співвідношення $\text{ED}_{50}/\text{LD}_{50}$.

Поняття "лікувати" або "лікування" у контексті даного опису стосується лікування хворобливого стану в хворих людей, де хворобливий стан пов'язаний з ростом пухлини передміхурової залози і включає хворобливі стани, при яких пацієнт має потребу в зниженні рівнів RG1.

Даний винахід стосується серед іншого нових поліпептидів RG1, полінуклеотидів rg1 і антитіл до поліпептидів RG1, що більш докладно описано нижче. Зокрема, винахід стосується нових поліпептидів RG1 і полінуклеотидів, які кодують ці поліпептиди RG1, і насамперед RG1, який має амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і rg1, який має полінуклеотидну послідовність, представлену на Фіг.1 (SEQ ID NO:

1). Під обсяг винаходу підпадають також варіанти RG1. Переважним варіантом RG1 є варіант, поліпептидна послідовність якого принаймні на 70% аналогічна (переважно ідентична принаймні на 70%) і більш переважно принаймні на 90% аналогічна (більш переважно ідентична принаймні на 90%) до поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і ще більш переважно принаймні на 95% аналогічна (ще більш переважно ідентична принаймні на 95%) до поліпептидної послідовності, представленої на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), а також включає ділянки таких поліпептидів, причому ділянка поліпептиду, як правило, містить принаймні 30 амінокислот і більш переважно принаймні 50 амінокислот.

Кодувальна послідовність виведеного поліпептиду RG1 починається на відстані 296 пар основ від 5'-кінця нуклеотидної послідовності, представленої на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1). RG1 містить три структурних домени, характерних для протеїнів позаклітинного матриксу суперсімейства Міндину/F-спондину: два домени спондину (FS1 і FS2), які складаються з амінокислот 31-103 і 138-221 відповідно, і домен тромбоспондину, який складається з амінокислот 278-330.

Одним з об'єктів даного винаходу є наявність структурної гомології, показаної на Фіг.3, між RG1 і щурячим міндином, іншим представником сімейства протеїнів позаклітинного матриксу. Амінокислотна послідовність RG1 приблизно на 89,7% аналогічна до щурячого міндину.

Ще одним об'єктом даного винаходу є профіль експресії RG1, зокрема його експресії в бібліотеках ліній тканини передміхурової залози і понадекспресії в бібліотеках ліній раку передміхурової залози. Цей профіль експресії в тканині доведений шляхом аналізу експресії мРНК у зразках тканини, які представляють собою здорові і пухлинні тканини за допомогою заснованого на ПЛР Taqman-аналізу. За допомогою цього аналізу продемонстровано, що для мРНК, яка кодує RG1, характерна понадекспресія в тканинах передміхурової залози в порівнянні з іншими тканинами.

Полінуклеотиди

Одним з об'єктів даного винаходу є виділені полінуклеотиди, які кодують поліпептид RG1, який має виведену амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

На основі наведених у даному описі даних, таких як дані про полінуклеотидну послідовність, представлену на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1), полінуклеотид за даним винаходом, який кодує поліпептид RG1, можна одержувати за допомогою стандартних методів клонування і скринінгу, наприклад, описаних для клонування кДНК із використанням як вихідного продукту мРНК, одержаної з клітин тканини людини. Винахід ілюструється тим фактом, що полінуклеотидна послідовність, представлена на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1), виявлена в клонах кДНК, одержаних із тканини передміхурової залози людини. Доказ експресії гена *rg1* у передміхуровій залозі одержано на основі бази даних Incyte's LifeSeq. Нуклеотидну послідовність ідентифікували за допомогою довідкового пошуку в базі даних з використанням програмного забезпечення "Protein

Function", розробленого фірмою Incyte з метою аналізу бази даних. Нуклеотидна послідовність виявлена в категорії молекул клітинної адгезії в довідковій базі даних і описана як гомолог f-спондину. Здійснений за допомогою ЕОМ Нозерн-аналіз розподілу полінуклеотидних послідовностей *rg1* у наборі бібліотек у базі даних дозволив знайти високі рівні експресії *rg1* у бібліотеках тканин передміхурової залози і більш низькі рівні в бібліотеках інших тканин, включаючи здорові і пухлинні тканини.

Після збирання набору клонів *rg1* у базах даних у безперервну полінуклеотидну послідовність і редагування безперервної послідовності в передбаченому зібраному полінуклеотиді була виявлена повнорозмірна кодувальна послідовність. Ця послідовність кодувала протеїн, гомологічний до щурячого міндину.

Для проведення експериментів були одержані Incyte-клони 1640796, 1712252 і 1880265 фірми Incyte, і був виявлений клон 3360733, який містить велику частину 5'-нуклеотидної послідовності. Цей клон повністю секвенували і було встановлено, що він містить повну кодувальну послідовність передбаченого протеїну RG1. Ця послідовність представлена на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1).

Полінуклеотиди за винаходом можуть мати форму РНК, наприклад, мРНК, або форму ДНК, включаючи, наприклад, кДНК і геномну ДНК, одержані шляхом клонування або за допомогою методів хімічного синтезу або комбінацією цих методів або за допомогою способу, наведеного в даному описі. ДНК може бути дволанцюговою або одноланцюговою. Одноланцюгова ДНК може включати кодувальний ланцюг (також відома як ДНК, що включає смисловий ланцюг), або вона може включати некодувальний ланцюг, яку також називають антисмисловим ланцюгом.

Послідовність, яка кодує поліпептид, може бути ідентична до кодувальної послідовності полінуклеотиду, представленої Фіг.1 (SEQ ID NO: 1). Це також може бути полінуклеотид, який має іншу послідовність, яка у результаті надмірності (виродженості) генетичного коду кодує поліпептид, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Полінуклеотиди за даним винаходом, які кодують поліпептид, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), можуть включати (але не обмежуючись ними) послідовність, яка кодує лише поліпептид; послідовність, яка кодує поліпептид, у сполученні з додатковими некодувальними послідовностями, включаючи (але не обмежуючись ними) інтрони і некодувальні 5'- і 3'-послідовності, такі як транскрибовані не трансльовані послідовності, які беруть участь у транскрипції, процесінгу мРНК (наприклад, сигнали сплайсингу і поліаденілювання), або додаткові кодувальні послідовності, які кодують додаткові амінокислоти, наприклад, такі, що забезпечують додаткові функції. Так, наприклад, поліпептид може бути злитий з маркерною послідовністю, такої як послідовність пептиду, що полегшує очищення злитого поліпептиду. У певних переважних варіантах цього об'єкта винаходу маркерна послідовність серед іншого може представляти собою пептид гексагістидин, такий як tag,

який знаходиться у векторі pTrcHisB (фірма Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія), багато і з маркерних послідовностей є в продажу. Як описано в Gentz і ін. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 821-824, 1989] гексагістидин, наприклад забезпечує зручне очищення злитого протеїну.

Полінуклеотиди можуть кодувати поліпептид, який представляє собою поліпептид, який включає додаткові аміно- або карбоксикінцеві амінокислоти, або амінокислоти, розташовані всередині поліпептиду (коли активна форма складається, наприклад, більше ніж з одного поліпептидного ланцюга). Такі послідовності серед іншого можуть відігравати роль в процесінгу поліпептиду з попередника до кінцевої форми, можуть полегшувати міграцію поліпептиду, можуть пролонгувати або скорочувати час напівжиття поліпептиду або можуть полегшувати обробку поліпептиду для аналізу або одержання. Як правило, *in situ* додаткові амінокислоти можуть бути відщеплені від поліпептиду за допомогою протеолітичних ферментів.

Даний винахід стосується також варіантів описаних вище полінуклеотидів, які кодують фрагменти, аналоги і похідні поліпептиду, що має виведену амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2). Варіант полінуклеотиду може представляти собою варіант, який зустрічається в природних умовах, такий як алельний варіант, що зустрічається в природних умовах, або може представляти собою варіант, який не зустрічається в природних умовах. Такі варіанти полінуклеотиду, що не зустрічаються в природних умовах, можна одержувати за допомогою методів мутагенезу, включаючи методи, застосовні до полінуклеотидів, клітин або організмів.

У цьому зв'язку варіанти можуть представляти собою варіанти, які відрізняються від вищеописаних полінуклеотидів наявністю полінуклеотидних замін, делецій або додавань. Заміни, делеції або додавання можуть стосуватися одного або декількох полінуклеотидів. У варіантах можуть бути зроблені зміни в кодувальних або некодувальних ділянках або і в тих, й в інших ділянках. Зміни в кодувальних ділянках включають консервативні або неконсервативні амінокислотні заміни, делеції або додавання.

У цьому плані серед найбільш переважних варіантів слід відзначити полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність RG1, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2); їх варіанти, аналоги, похідні і фрагменти і фрагменти варіантів, аналогів і похідних.

У цьому плані особливо переважними є полінуклеотиди, які кодують варіанти, аналоги, похідні і фрагменти RG1 і варіанти, аналоги і похідні фрагментів, які мають амінокислотну послідовність поліпептиду RG1, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), у якій у будь-якій комбінації декілька, небагато, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 амінокислотний(і) залишок(и) замінений(і), доданий(і) або вилучений(і), або жоден із амінокислотних залишків не замінений, доданий чи вилучений. Найбільш переважними в цьому плані є мовчазні мутації додавання або делеції, які не змінюють властивості й активність поліпептиду RG1. Також особливо переважними в

цьому плані є консервативні заміни. Найбільш переважними є полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), яка не містить заміни.

Також переважними варіантами здійснення винаходи є полінуклеотиди, які принаймні на 70% ідентичні до полінуклеотиду, що кодує поліпептид RG1, який має амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і полінуклеотиди, комплементарні до таких полінуклеотидів. В альтернативному варіанті особливо переважними є полінуклеотиди, які включають ділянку, принаймні на 80% ідентичну до полінуклеотиду, що кодує поліпептид RG1, і полінуклеотиди, комплементарні до них. Найбільш переважними є полінуклеотиди, ідентичні до нього принаймні на 90% і ще більш переважними є полінуклеотиди, ідентичні до нього принаймні на 95%. Крім того, полінуклеотиди, ідентичні принаймні на 97% є більш переважними, ніж ті, які ідентичні принаймні на 95%, полінуклеотиди, ідентичні принаймні на 98% і принаймні на 99%, є ще більш переважними, а ідентичні принаймні на 99% є найбільш переважними.

Крім того, у цьому плані найбільш переважними варіантами здійснення є полінуклеотиди, які кодують поліпептиди, що зберігають таку ж біологічну активність, що й поліпептид, кодований полінуклеотидною послідовністю, представлену на Фіг.1 (SEQ ID NO: 1).

Даний винахід стосується також полінуклеотидів, які гібридизуються з вищеописаними послідовностями. У цьому плані винахід насамперед стосується полінуклеотидів, які гібридизуються з описаними вище полінуклеотидами в строгих умовах.

Як буде додатково обговорено при описуванні методів аналізу полінуклеотидів, вказані вище полінуклеотиди за винаходом, можна, наприклад, використовувати як зонди для гібридизації кДНК і геномної ДНК із метою виділення повнорозмірних кДНК і геномних клонів, які кодують RG1, і з метою виділення кДНК і геномних клонів інших генів, послідовності, яких мають високий ступінь аналогії з геномом rg1. Такі зонди, як правило, включають принаймні 15 основ. Переважно такі зонди мають принаймні 30 основ і можуть мати принаймні 50 основ.

Наприклад, кодувальну ділянку гена rg1 можна виділяти шляхом скринінгу бібліотек за допомогою синтетичних олігонуклеотидних зондів, які створені з використанням відомої послідовності ДНК. Наприклад, для скринінгу бібліотеки кДНК або геномної ДНК із метою ідентифікації клонів, що гібридизуються з зондом, можна застосовувати мічений олігонуклеотид, який має послідовність, комплементарну до послідовності полінуклеотиду за даним винаходом.

Таким чином, полінуклеотид за даним винаходом може кодувати поліпептид, поліпептид плюс лідерну послідовність (який може бути позначений як передполіпептид).

Мається на увазі, що винахід стосується також серед іншого полінуклеотидів, які кодують фрагменти поліпептидів, полінуклеотидів, що гібриди-

зуються з полінуклеотидами, які кодуєть фрагменти поліпептидів, насамперед які гібридизуються в строгих умовах, і полінуклеотидів, таких як ПЛР-праймери, для ампліфікації полінуклеотидів, які кодуєть фрагменти поліпептидів. У цьому плані переважними полінуклеотидами є полінуклеотиди, які відповідають описаним нижче переважним фрагментам поліпептидів.

Поліпептиди

Даний винахід стосується також поліпептиду RG1, який має виведену амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Винахід стосується також фрагментів, аналогів і похідних цих поліпептидів. Поняття фрагмент, похідне й аналог стосовно поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), означає поліпептид, який у цілому зберігає таку ж біологічну активність, що й у поліпептиду RG1.

Поліпептид за винаходом може представляти собою рекомбінантний поліпептид, які зустрічається в природних умовах або синтетичний поліпептид. У певних переважних варіантах він представляє собою рекомбінантний поліпептид.

Фрагмент, похідне або аналог поліпептиду, представленого на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), може представляти собою (I) поліпептид, у якому один або декілька амінокислотних залишків замінені консервативними або неконсервативними амінокислотними залишками (переважно консервативним амінокислотним залишком) і такий замінювальний амінокислотний залишок, може кодуватися або не кодуватися генетичними кодом, або (II) поліпептид, у якому один або декілька амінокислотних залишків включає заміщувану групу, або (III) поліпептид, злитий з іншою сполукою, наприклад, з сполукою, яка збільшує час напівжиття поліпептиду (наприклад, поліетиленгліколь), або (IV) поліпептид, у якому з поліпептидом злиті додаткові амінокислоти, такі як лідерна або секреторна послідовність, або послідовність, застосовувана для очищення поліпептиду. Такі фрагменти, похідні й аналоги повинні стати очевидні фахівцям у даній галузі після ознайомлення з даним описом.

У цьому плані серед особливо переважних варіантів здійснення слід відзначити поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність RG1, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), їх варіанти, аналоги, похідні і фрагменти і варіанти, аналоги і похідні фрагментів.

Переважними є варіанти, які відрізняються від еталонної послідовності консервативними амінокислотними замінами. Такі заміни представляють собою заміну даної амінокислоти в поліпептиді іншою амінокислотою, яка має близькі характеристики. Як правило, як консервативні розглядаються заміни одна на одну аліфатичних амінокислот Ala, Val, Leu і Ile, взаємозаміна залишків Ser і Thr, які несуть гідроксильні групи, заміна один на одного залишків кислих амінокислот Asp і Glu, заміна один на одного залишків Asn і Gln, які містять амідну групу, заміна один на одного залишків основних амінокислот Lys і Arg і заміни залишків ароматичних амінокислот Phe і Tyr.

У цьому плані також особливо переважними є варіанти, аналоги, похідні і фрагменти і варіанти,

аналоги і похідні фрагментів, які мають амінокислотну послідовність RG1, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), у яких у будь-якій комбінації декілька, небагато, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 амінокислотний(і) залишок(и) замінений(і), доданий(і) або видалений(і), або жоден з амінокислотних залишків не замінений, доданий або видалений. Найбільш переважними в цьому плані є мовчазні заміни, делеції або додавання, які не змінюють властивості й активності поліпептиду RG1. Також особливо переважними в цьому плані є консервативні заміни. Найбільш переважними є поліпептиди, які мають амінокислотну послідовність, представлену на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), яка не містить заміни.

Переважно поліпептиди і полінуклеотиди за даним винаходом знаходяться у виділеній формі й особливо переважно очищені до гомогенного стану.

Поліпептиди за даним винаходом також включають поліпептид, представлений на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), а також поліпептиди, які принаймні на 70% аналогічні (переважно принаймні на 70% ідентичні) до поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і більш переважно, які принаймні на 90% аналогічні (переважно принаймні на 90% ідентичні) до поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і ще більш переважно, які принаймні на 95% аналогічні (переважно принаймні на 95% ідентичні) до поліпептиду, представленому на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), і також включають ділянки таких поліпептидів, причому, така ділянка поліпептиду, як правило, містить принаймні 30 амінокислот і більш переважно принаймні 50 амінокислот.

Як відомо в даній галузі "ступінь аналогічності" між двома поліпептидами визначають, порівнюючи амінокислотну послідовність і консервативні амінокислотні заміни в одному поліпептиді з послідовністю другого поліпептиду.

Фрагменти або ділянки поліпептидів за даним винаходом можна застосовувати для одержання відповідних повнорозмірних поліпептидів за допомогою пептидного синтезу; таким чином, фрагменти можна застосовувати як проміжні продукти для одержання повнорозмірних поліпептидів. Фрагменти

Переважними варіантами здійснення даного винаходу є також поліпептиди, які містять фрагменти RG1, найбільш переважно фрагменти RG1, представленого на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

У цьому контексті фрагмент представляє собою поліпептид, який має амінокислотну послідовність, яка повністю співпадає з частиною, але не всією амінокислотою послідовністю описаних вище поліпептидів RG1 і їх варіантів або похідних.

Такі фрагменти можуть представляти собою "які окремо знаходяться" фрагменти, тобто фрагменти, які не є частиною або не злиті з іншими амінокислотами або поліпептидами, або вони можуть знаходитися в складі більш великого поліпептиду, утворюючи тим самим його ділянку. Якщо вони входять до складу більш великого поліпептиду, то згідно із даним винаходом найбільш переважними є фрагменти, які утворюють окрему безперервну ділянку. Однак деякі компоненти можуть входити до складу одного більш великого поліпеп-

тиду. Наприклад, певними переважними варіантами здійснення є фрагмент поліпептиду RG1 за даним винаходом, який входить до складу поліпептиду-попередника, створеного з метою експресії в хазяїні і який несе гетерологічні перед- і прополіпептидні ділянки, злиті з N-кінцем RG1-фрагмента, і додаткову ділянку, зливу з C-кінцем фрагмента. Таким чином, зокрема, під фрагментом у контексті даного опису розуміють частину або частини злилого поліпептиду або злилого протеїну, одержаного з RG1.

Як репрезентативні приклади фрагментів поліпептидів за винаходом можна відзначити фрагменти, які включають від приблизно 25 до приблизно 331 амінокислот.

У цьому контексті "приблизно" включає конкретно вказаний діапазон і діапазони, які більше або менше або одного з крайніх значень, або обох крайніх значень на декілька, небагато, 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислоту. Наприклад, у цьому контексті фрагмент довжиною приблизно 331 амінокислот означає фрагмент поліпептиду, який має довжину від 25 амінокислот плюс або мінус декілька, невелику кількість, 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислота до 331 плюс мінус декілька, невелику кількість, 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислотних(ий) залишків(ок), тобто діапазон включає як від 25 мінус декілька амінокислот до 331 плюс декілька амінокислот, так і від 25 плюс декілька амінокислот до 331 мінус декілька амінокислот.

У цьому плані більш переважними є вказані діапазони, у яких одне або обидва крайніх значень відрізняються на плюс або мінус 5 амінокислот. Ще більш переважними є вказані діапазони, у яких одне або обидва крайніх значень відрізняються на плюс або мінус 3 амінокислоти. Найбільш переважно, коли в вказаних діапазонах одне або обидва крайніх значень відрізняються на плюс або мінус 1 амінокислоту, або коли діапазони строго відповідають вказаним граничним значенням. І найбільш переважними є фрагменти, які включають від приблизно 25 до приблизно 331 амінокислоти.

Серед найбільш переважних фрагментів за винаходом можна відзначити зрізані мутанти RG1. Зрізані мутанти RG1 включають варіанти або похідні послідовності, представлені на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), за винятком делецій безперервних рядів залишків (тобто безперервної ділянки, або частини ділянки), що включають N-кінець послідовності, представлені на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2), або безперервних рядів залишків, що включають C-кінець, або у випадку мутантів з подвійним зрізуванням - делецій двох безперервних рядів залишків, один із яких містить N-кінець, а другий містить C-кінець. Фрагменти, які мають розмір, що знаходиться в вказаному вище діапазоні, також представляють собою переважні варіанти здійснення зрізаних фрагментів, які у цілому є найбільш переважними фрагментами.

Відповідно до цього об'єкта винаходу особливі переважними є фрагменти, які відрізняються наявністю біологічної і/або імунологічної активності, властиві RG1. Такі фрагменти включають фрагменти, які включають передбачені структурні домени RG1, що складаються принаймні з

амінокислот у положенні від 31 до 103, від 138 до 221 і від 278 до 330, або фрагменти, які застосовують для одержання антитіл, наприклад, описані в прикладі 4.

Конкретні переважні в цьому плані ділянки наведені на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2) і включають (але не обмежуючись ними) ділянки вказаних вище типів, виявлені за допомогою аналізу амінокислотної послідовності, представленої на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Серед найбільш переважних фрагментів за винаходом можна відзначити фрагменти, які включають ділянки RG1, що об'єднують декілька структурних особливостей, таких як описані вище особливості. У цьому плані найбільш переважними ділянками є два домени спондину й один домен тромбоспондину, що знаходяться приблизно від амінокислоти в положенні 31 до 103, від 138 до 221 і від 278 до 330 відповідно, що характерно для суперсімейства Міндину/спондину протеїнів позаклітинного матриксу. Такі ділянки можуть включати більш великі поліпептиди або можуть самі бути переважним фрагментом за даним винаходом, як вказано вище. У цьому розділі поняття "приблизно" має вказане вище значення і стосується фрагментів у цілому.

Також переважними є ділянки, які опосередковують активність RG1. У цьому плані найбільш переважними є фрагменти, які мають хімічні, біологічні або інші види активності RG1, включаючи фрагменти, які мають таку ж або більш високу активність або які мають більш низьку небажану активність. Найбільш переважними в цьому плані є фрагменти, які містять ділянки, гомологічні за послідовністю або які знаходяться в такому ж положенні, або і гомологічні за послідовністю і які знаходяться в такому ж положенні, що й активні ділянки споріднених поліпептидів, наприклад, інших протеїнів сімейства міндину, до якого належить RG1.

Вектори, клітини-хазяїни і системи експресії

Даний винахід стосується також векторів, які включають полінуклеотиди за даним винаходом, клітин-хазяїв, які генетично конструюють з використанням векторів за винаходом, і одержані поліпептидів за винаходом за допомогою методів рекомбінації. Такі методи описані в [Sambrook і ін., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 і в Ausubel P.M. і ін., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989].

Клітини-хазяїни можна створювати за допомогою методів генетичної інженерії з метою включення полінуклеотидів і експресії поліпептидів за даним винаходом. Наприклад, полінуклеотиди можна інтродукувати у клітини-хазяїни за допомогою добре відомих методів зараження, трансдукції, трансфекції, трансекції і трансформації. Полінуклеотиди можна інтродукувати окремо або в сполученні з іншими полінуклеотидами. Такі додаткові полінуклеотиди можна інтродукувати незалежно, інтродукувати разом або інтродукувати після зв'язування з полінуклеотидами за винаходом.

Так, наприклад, полінуклеотидами за винаходом можна трансфектувати клітини-хазяїни, на-

приклад, клітини ссавців, разом з іншим окремим полінуклеотидом, який кодує селектований маркер, з використанням стандартних методів спільної трансфекції (котрансфекції) і селекції. У цьому випадку полінуклеотиди повинні бути стабільно інтегровані в геном клітини-хазяїна.

В альтернативному варіанті полінуклеотиди можна зв'язувати з вектором, який містить селектований маркер, для розмноження в хазяїні. Векторну конструкцію можна інтродукувати в клітини-хазяїни за допомогою вищевказаних методів. Як правило, плазмідний вектор інтродукують у клітини-хазяїни у вигляді ДНК у преципітаті, такому як преципітат фосфату кальцію, або у вигляді комплексу з зарядженим ліпідом. Для інтродукції полінуклеотидів у хазяїна також можна використовувати електropорацію. Якщо вектор представляє собою вірус, то його можна упаковувати *in vitro* або інтродукувати в упаковальну клітину і упакований вірус можна трансдукувати у клітини. Широка різноманітність методів, які можна застосовувати для одержання полінуклеотидів і для інтродукції полінуклеотидів у клітини, є добре відомими і стандартними для фахівців у даній галузі. Такі методи повністю узагальнені в процитованому вище довіднику Sambrook зі співавторами, у якому проілюстровані багато посібників із проведення лабораторних досліджень з описом деталей цих методів. Відповідно до цього об'єкта винаходу вектор може представляти собою, наприклад, плазмідний вектор, одно- або дволанцюговий фаговий вектор, вірусний РНК-овий або ДНК-овий вектор, де РНК або ДНК можуть бути одно- або дволанцюговими. Такі вектори можна інтродукувати у клітини у вигляді полінуклеотидів, переважно ДНК, за допомогою добре відомих методів інтродукції ДНК і РНК у клітини. У випадку фагових і вірусних векторів їх також можна і переважно інтродукувати у клітини у вигляді упакованого або капсульованого вірусу з використанням добре відомих методів зараження і трансдукції. Вірусні вектори можуть бути реплікон-компетентними або реплікон-дефіцитними. В останньому випадку розмноження вірусу, як правило, відбувається лише в комплементувальних клітинах-хазяїнах.

У певних аспектах переважними є вектори, призначені для експресії полінуклеотидів і поліпептидів за даним винаходом. Як правило, такі вектори включають діючі в цис-напрямі контролюючі ділянки, ефективні для експресії в хазяїні, функціонально зв'язані з полінуклеотидом, який підлягає експресії. Відповідні діючі в транс-напрямі фактори надаються або хазяїном, або комплементувальним вектором, або самим вектором при інтродукції в хазяїні.

У цьому зв'язку конкретними переважними варіантами є вектори, призначені для специфічної експресії. Така специфічна експресія може представляти собою індукцибельну експресію або експресію лише у певних типах клітин або як індукцибельну, так і специфічну для певних клітин експресію. Серед індукцибельних векторів найбільш переважними є вектори, експресію яких можна індукувати за допомогою факторів навколишнього середовища, якими легко маніпулювати,

такими як температура або харчові добавки. Різні вектори за винаходом, включаючи конститутивні і індукцибельні експресійні вектори, які можна застосовувати в прокаріотичних і еукаріотичних хазяїнах, є добре відомими і відповідають звичайно застосовуваним фахівцями в даній галузі.

Сконструйовані клітини-хазяїни можна культивувати в загальноприйнятому живильному середовищі, яке при необхідності можна модифікувати серед іншого з метою активації промоторів, відбирання трансформантів або ампліфікації генів. Умови культивування, такі як температура, значення рН і т.п., раніше застосовували для клітини-хазяїна, відібраного для здійснення експресії, як правило, придатні для експресії поліпептидів за даним винаходом, що повинно бути очевидно фахівцям у даній галузі.

Для експресії поліпептиду за винаходом можна використовувати широку різноманітність експресійних векторів. Такі вектори включають хромосомні, епісомні і вектори, які походять з вірусу, наприклад, вектори, які походять з бактеріальних плазмід, з бактеріофагів, їх епісом дріжджів, з елементів хромосом дріжджів, з вірусів, таких як бакуловірус, паповавірус, такий як SV40, вірус коров'ячої віспи, аденовірус, вірус віспи свійських птахів, вірус псевдосказу, ретровірус і альфавірус, такий як Синдбіс-вірус, і вектори, одержані шляхом їх комбінацій, такі як одержані з генетичних елементів плазмиди і бактеріофага, наприклад, косміди і фагміди, причому відповідно до даного об'єкта винаходу всі ці віруси можна застосовувати для експресії. Як правило, для експресії можна застосовувати будь-який вектор, придатний для підтримання, розмноження або експресії полінуклеотидів з метою експресії поліпептиду в хазяїні.

Відповідну послідовність ДНК можна вбудовувати у вектор за допомогою будь-якої із широкої різноманітності відомих і стандартних методик. У цілому, послідовність ДНК, призначену для експресії, зв'язують з експресійним вектором шляхом розщеплення послідовності ДНК і експресійного вектора за допомогою однієї або декількох рестриктаз, і наступного об'єднання рестрикційних фрагментів за допомогою ДНК-лігази фага T4. Методи рестрикції і зв'язування шляхом лігування, які можна використовувати для цієї мети, добре відомі і є стандартними для фахівців у даній галузі. Альтернативні методи рестрикції і зв'язування шляхом лігування, а також конструювання експресійних векторів, які також добре відомі і є стандартними для фахівців у даній галузі, викладені більш докладно в процитованому вище посібнику Sambrook зі співавторами.

Послідовність ДНК у експресійному векторі функціонально зв'язують з відповідними(ою) контролюючими(ою) експресію послідовностями(тєю), включаючи, наприклад, промотор для напрямку транскрипції мРНК. Лише деякими репрезентативними прикладами таких добре відомих промоторів є промотор PL фага лямбда, промотори lac, trp, tac і trc E. coli, ранні і пізні промотори SV40 і промотори ретровірусних LTR (довгі повтори РНК на кінцях генома). Слід розуміти, що відповідно до цього об'єкта винаходу можна застосовувати численні не

згадані промотори, які добре відомі і які фахівці в даній галузі можуть легко використовувати в такий же спосіб, що проілюстрований і обговорений нижче в прикладах.

У цілому, конструкції для експресії повинні містити сайти для ініціації і термінації транскрипції й у транскрибованій ділянці - необхідний для трансляції сайт зв'язування рибосом. Кодувальна ділянка транскриптів, які експресуються за допомогою конструкцій, повинна включати сайт ініціації AUG на початку і відповідним чином розташований термінуючий кодон на кінці поліпептиду, який підлягає трансляції.

Крім того, конструкції можуть містити контролюючі ділянки, які регулюють, а також ініціюють експресію. Як правило, відповідно до різноманітних звичайно застосовуваних методик, такі ділянки, зокрема, сайти зв'язування репресора і енхансери, можуть контролювати транскрипцію.

Вектори для розмноження й експресії, як правило, повинні включати селектовані маркери. Такі маркери також можна застосовувати для ампліфікації, або вектори можуть містити додаткові маркери для цієї мети. У цьому зв'язку експресійні вектори переважно містять один або декілька селектованих маркерних генів для забезпечення прояву фенотипічної ознаки з метою відбору трансформованих клітин-хазяїнів. Переважні маркери включають гени, які зумовлюють стійкість до дигідрофолатредуктази, неомицину, пуроміцину або гігromіцину, для культури еукаріотичних клітин і гени, що зумовлюють стійкість до тетрацикліну, теоміцину, канаміцину або ампіциліну, для культури *E. coli* та інших бактерій.

Вектор, який містить відповідну послідовність ДНК, описану вище, а також відповідний промотор і інші відповідні контролюючі послідовності, можна інтродуктувати у відповідного хазяїна за допомогою різних добре відомих методик, придатних для експресії в ньому потрібного поліпептиду. Репрезентативні приклади відповідних хазяїнів включають бактеріальні клітини, такі як клітини *E. coli*, *Streptomyces* і *Salmonella typhimurium*; грибні клітини, такі як клітини дріжджів; клітини комах, такі як клітини лінії S2 *Drosophila* і лінії Sf9 *Spodoptera*; клітини тварин, такі як клітини CHO, COS і меляноми Бовеса; і рослинні клітини, переважно клітини комах лінії BTI-TN-5B1-4. Хазяїни, у яких можна здійснювати експресію широкої різноманітності конструкцій, добре відомі, і фахівці в даній галузі, виходячи з даного опису, легко можуть вибрати хазяїна для експресії поліпептидів за винаходом.

Для експресії також можна застосовувати різні системи культур клітин ссавців. Приклади систем експресії ссавців включають лінії COS-7 фібробласта нирки мавпи [Gluzman і ін., Cell, 23: 175, 1991]. Інші лінії клітин, у яких може відбуватися експресія сумісного вектора, включають, наприклад, лінії клітин C127, 3T3, CHO, HeLa, лінію клітин нирки людини 293 і лінію BHK. У клітинах ссавців-хазяїнів можна застосовувати численні засновані на вірусах експресійні системи. У випадку, коли як експресійний вектор використовується аденовірус, полінуклеотид, який кодує поліпептид RG1, можна вбудовувати шляхом лігування в комплекс транс-

крипції/трансляції аденовірусу, що включає пізній промотор і лідерну послідовність, яка складається з трьох частин. Вбудовування в ділянку E1 або E3 вірусного генома, яка не має вирішального значення, повинно привести до одержання життєздатного вірусу, який має здатність експресувати RG1 у заражених клітинах-хазяїнів [Logan і Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3655-3659, 1984]. Крім того, енхансери транскрипції, такі як енхансер вірусу саркоми Раяса (RSV) можна застосовувати для посилення експресії в клітинах ссавців-хазяїнів.

Більш конкретно, даний винахід включає також рекомбінантні конструкції, такі як конструкції для експресії, що включають одну або декілька описаних вище послідовностей. Конструкції включають вектор, такий як плазмідний або вірусний вектор, у який повинна бути вбудована конструкція за винаходом. Послідовність можна вбудовувати в прямій або зворотній орієнтації. У визначених переважних варіантах конструкція додатково включає регуляторні послідовності, у тому числі, наприклад, промотор, функціонально зв'язаний з послідовністю. Фахівцям у даній галузі відомо велика кількість прийнятних векторів і промоторів і багато наявних в продажі вектори можна застосовувати відповідно до даного винаходу.

Наступні вектори, що є в продажі, наведені як приклад. Серед векторів переважними для застосування в бактеріях є pQE70, pQE60 і pQE-9, що поставляються фірмою Qiagen США (Валенсія, штат Каліфорнія); вектори pBS, вектори Phagescript®, вектори Bluescript®, pNHSA, pNH16a, pNH18A, pNH46A, що поставляються фірмою Stratagene (Ла Жолла, штат Каліфорнія); і ptc99, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, що поставляються фірмою Pharmacia Biotech (Піскатавей, штат Нью-Джерсі). Найбільш переважним є вектор pTcHisB, що поставляється фірмою Invitrogen. Переважними еукаріотичними векторами є pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1 і pSG, що поставляються фірмою Stratagene; і PSVK3, pBPV, pMSG і pSV1, що поставляються фірмою Pharmacia Biotech. Найбільш переважним є вектор pCIneo, що поставляється фірмою Promega. Ці вектори перераховані лише як ілюстрація цілого ряду наявних у продажі і добре відомих векторів, що можуть застосовуватися фахівцями в даній галузі відповідно до цього об'єкта винаходу. Зрозуміло, що будь-які інші плазмідні або вектори, придатні, наприклад, для інтродукції, підтримування, розмноження або експресії полінуклеотиду або поліпептиду за винаходом в хазяїні, можна застосовувати відповідно до цього об'єкта винаходу.

Промоторні ділянки можна вибирати з будь-якого потрібного гена, використовуючи вектори, які містять репортерну транскрипційну одиницю, позбавлену промоторної ділянки, таку як транскрипційна одиниця хлорамфеніколацетилтрансферази ("cat"), розташовану по ходу транскрипції сайту або сайтів рестрикції, для інтродукції промоторного фрагмента-кандидата тобто фрагмента, що може містити промотор. Як добре відомо, інтродукція у вектор фрагмента, що містить промотор, в сайт рестрикції, розташований проти ходу транс-

крипції щодо гена *cat*, підсилює утворення CAT-активності, що можна виявити за допомогою стандартних аналізів CAT. Вектори, придатні для цієї мети, добре відомі і легко доступні. Як приклад двох таких векторів можна відзначити рКК232-В і рСМ7. Таким чином, для експресії полінуклеотидів за даним винаходом можна застосовувати не лише добре відомі і легко доступні промотори, але також і промотори, що легко можуть бути одержані за допомогою вищевикладеного методу з використанням репортерного гена.

З відомих бактеріальних промоторів, придатних для експресії полінуклеотидів і поліпептидів згідно із даним винаходом, слід відзначити промотори *lacI* і *lacZ* *E. coli*, промотори фагів T3 і T7, промотор *tac* фага T5, промотори PR, P1 фага лямбда, промотор *trp* і гібридний промотор *trc*, одержаний із промоторів *trp* і *lac*. З відомих еукаріотичних промоторів придатними в цьому плані є безпосередній ранній промотор CMV, промотор тимідинкінази HSV, ранній і пізній промотори SV40, промотори ретровірусних LTR, такі як промотори вірусу саркоми Рауса ("RSV"), і промотори металотіонеїну, такий як мишиний промотор металотіонеїну-1.

Вибір відповідних векторів і промоторів для експресії в клітині-хазяїні є добре відомою процедурою і вимоги до методик конструювання експресійних векторів, інтродукції вектора в хазяїна й експресії в хазяїні є стандартними для фахівців у даній галузі.

Як правило, рекомбінантні експресійні вектори повинні включати сайти ініціації реплікації, промотор, одержаний з гена з високим рівнем експресії, для здійснення транскрипції по ходу транскрипції структурної послідовності і селектований маркер для здійснення виділення клітин, які містять вектор, після обробки вектором.

Даний винахід стосується також клітин-хазяїнів, які містять вищевказані конструкції, що описані вище. Клітина-хазяїн може представляти собою клітину вищого еукаріотичного організму, таку як клітина ссавця, або клітину нижчого еукаріотичного організму, таку як клітина дріжджів, або клітина-хазяїн може представляти собою прокаріотичну клітину, таку як бактеріальна клітина. У клітинах-хазяях можна застосовувати загальноприйнятим способом конструкції, призначені для одержання генного продукту, який кодується рекомбінантною послідовністю.

Поліпептиди можна експресувати у клітинах ссавців, дріжджів, бактерій або в інших клітинах під контролем відповідних промоторів. Для одержання таких протеїнів також можна застосовувати безклітинні системи трансляції з використанням РНК, одержаних з конструкцій ДНК за даним винаходом.

Відповідні клонувальні і експресійні вектори, які можна застосовувати в сполученні з прокаріотичними і еукаріотичними хазяїнами, описані в процитованому раніше посібнику Sambrook зі співавторами.

Транскрипцію ДНК, які кодує поліпептиди за даним винаходом, у вищих еукаріотах можна підсилювати шляхом вбудовування у вектор енхан-

серної послідовності. Енхансери представляють собою елементи ДНК, що цис-діють, як правило довжиною 10-300 пар основ, дія яких полягає в підвищенні транскрипційної активності промотору в даному типі клітини-хазяїна. Приклади енхансерів включають енхансер SV40, який локалізований на кінці сайту ініціації транскрипції в ділянці від 100 до 270 пар основ, енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми на кінці сайту ініціації транскрипції і енхансери аденовірусів.

Полінуклеотиди за винаходом, які кодує гетерологічну структурну послідовність поліпептиду за винаходом, як правило, повинні бути вбудовані у вектор за допомогою стандартних методик так, щоб для забезпечення їх експресії вони були функціонально зв'язані з промотором. Полінуклеотиди повинні бути розташовані так, щоб сайт початку транскрипції був локалізований у напрямі 5'-кінця відносно сайту зв'язування рибосом. Сайт зв'язування рибосом повинен бути розташований на 5'-кінці відносно AUG, що ініціює трансляцію поліпептиду, який підлягає експресії. Як правило, не повинні бути присутніми ніякі інші відкриті рамки читання, які починалися б на ініціюючому кодоні, звичайно AUG, і знаходилися б між сайтом зв'язування рибосом і ініціюючим кодоном AUG. Також, як правило, на кінці поліпептиду повинні бути присутніми стоп-кодони трансляції і повинні бути присутніми сигнали поліаденілювання і сигнал термінації транскрипції, розташовані в напрямку 3'-кінця транскрибованої ділянки.

Для секреції протеїну після його трансляції в порожнину ендоплазматичного ретикулума, у периплазматичний простір або у позаклітинне оточення в експресований поліпептид можуть бути включені відповідні сигнали секреції. Сигнали можуть бути ендегенними відносно поліпептиду, або вони можуть представляти собою гетерологічні сигнали. Поліпептид можна експресувати у модифікованій формі, такий як злитий протеїн, і він може включати не лише сигнали секреції, але також і додаткові гетерологічні функціонально активні ділянки. Так, наприклад, до N-кінця поліпептиду можна додавати ділянку додаткових амінокислот, зокрема заряджених амінокислот, для поліпшення стабільності і персистентності в клітині-хазяїні в процесі очищення або в процесі подальшої обробки і зберігання. Крім того, до поліпептиду також можна додавати спеціальні ділянки з метою полегшення очищення. Такі ділянки можуть бути видалені до кінцевої стадії одержання поліпептиду. Додавання до поліпептидів пептидних фрагментів серед іншого з метою посилення секреції або екскреції, з метою поліпшення стабільності і полегшення очищення є відомим і його здійснюють за допомогою загальноприйнятих методик у даній галузі. Наприклад, коли для індукції антитіл необхідні великі кількості RG1, можуть бути потрібні вектори, які забезпечують високий рівень експресії злитих протеїнів, що легко піддаються очищенню. Такі вектори включають (але не обмежуючись ними) багатофункціональні клонувальні і експресійні вектори *E. coli*, такі як Bluescript® (фірма Stratagen), у які кодувальна послідовність *rg1* мо-

же бути вбудована шляхом лігування у вектор у рамку зчитування N-кінцевого Met і субпослідовності 7 залишків β-галактозидази так, що продукується гібридний протеїн; вектор pIN [Van Heede і Shuster, J. Biol. Chem., 264: 5503-5509, 1989] і т.п. Вектори pTrcHis (фірма Invitrogen, Карлсбад, штат Каліфорнія) можна використовувати для експресії чужорідних поліпептидів у вигляді злитих протеїнів, які містять поліістидинову мітку (6xHis) для швидкого очищення. Протеїни, одержані в таких системах, конструюють так, щоб вони включали сайти розщеплення, такі як сайт розщеплення ентерокіназою, у результаті чого в разі потреби клонований поліпептид, що представляє інтерес, може вивільнитися зі злитого пептидного фрагмента.

Після трансформації прийнятної лінії хазяїна і вирощування лінії хазяїна до потрібної щільності клітин індукційні промотори, якщо вони присутні, можна індукувати відповідними стимулами (наприклад, зсувом температури або обробкою хімічним індукуючим агентом) і культивувати клітини протягом додаткового періоду часу.

Потім, як правило, клітини збирають центрифугуванням, руйнують фізичним або хімічним шляхом і утворений неочищений екстракт зберігають для подальшого очищення.

Застосовувані для експресії протеїну клітини мікроорганізмів можна руйнувати будь-яким загальноприйнятим методом, у тому числі з використанням циклів заморожування-відтавання, опромінення ультразвуком, механічного руйнування або за допомогою агентів, які лізують клітини, ці методи добре відомі фахівцям у даній галузі.

Поліпептид RG1 можна виділяти й очищати від культур рекомбінантних клітин за допомогою добре відомих методів, таких як осадження сульфатом амонію або етанолом, екстракція кислотою, аніон- або катіонообмінна хроматографія, хроматографія на фосфоцелюлозі, хроматографія, заснована на гідрофобній взаємодії, афінна хроматографія, хроматографія на гідроксилапатиті і хроматографія на лецитині. Найбільш переважно для очищення використовувати рідинну хроматографію високого розділення ("РХВР"). Для поновлення складчастості протеїну з метою відновлення активної конформації у випадку, коли протеїн був денатурований у процесі виділення і/або очищення, можна застосовувати добре відомі методи. Різні інші методи очищення протеїнів, добре відомі в даній галузі, включають методи, описані в [Deutscher M, у: *Methods in Enzymology*, том 182, Academic Press, San Diego, 1982; і в Scopes R. у: *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982].

В альтернативному варіанті поліпептиди за даним винаходом можна одержувати шляхом прямого пептидного синтезу з використанням методик твердофазного синтезу [Stewart і ін., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield J., J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154, 1963]. Синтез протеїнів *in vitro* можна здійснювати вручну або автоматично. Автоматичний синтез можна проводити, наприклад, з використанням пептидного синтезатора типу Applied

Biosystems 431A (фірма Perkin Elmer, Фостер Сіті, штат Каліфорнія) відповідно до інструкцій виробника. Різні фрагменти RG1 можна синтезувати хімічним шляхом окремо і з'єднувати за допомогою хімічних методів з одержанням повнорозмірної молекули.

Поліпептиди за даним винаходом включають очищені продукти, які зустрічаються в природних умовах, продукти, одержані хімічним синтезом, і продукти, одержані за допомогою методів рекомбінації з використанням прокаріотичних або еукаріотичних хазяїнів, таких, наприклад, як клітини бактерій, дріжджів, вищих рослин, комах і ссавців. Залежно від хазяїна, використовованого для одержання поліпептидів рекомбінантним шляхом, поліпептиди за даним винаходом можуть бути глікозильовані або не глікозильовані. Крім того, поліпептиди за винаходом можуть також включати попередньо модифікований залишок метіоніну, що в деяких випадках є результатом пов'язаних з хазяїном процесів.

Застосування поліпептидів RG1 і полінуклеотидів, які їх кодують

Відповідно до винаходу полінуклеотиди rg1 і поліпептиди RG1 можна використовувати для різних цілей, зокрема на основі хімічних і біологічних властивостей RG1. Додаткові шляхи застосування пов'язані з діагностикою і лікуванням порушень клітинної проліферації, таких як рак передміхурової залози. Ці об'єкти винаходу додатково проілюстровані й обговорені нижче і наведені в описі.

Можливість застосування полінуклеотидних і поліпептидних послідовностей за даним винаходом частково зумовлена хімічною і структурною гомологією між RG1 за винаходом і інших молекулах позаклітинного матриксу і переважною експресією RG1 у тканинах передміхурової залози в порівнянні з іншими тканинами. RG1 можна застосовувати для діагностики і лікування станів, порушень або захворювань, пов'язаних з аномальним ростом тканини передміхурової залози. Вони включають (але не обмежуючись ними) рак і метастатичний ріст пухлини.

Полінуклеотидні послідовності rg1 можна застосовувати як ДНК-зонди і як мішені для антисмислової і рибозимної терапії або як матриці для одержання антисмислових полінуклеотидів.

Поліпептиди RG1 можна застосовувати для вироблення антитіл до RG1, які можна використовувати для виявлення рівнів поліпептиду RG1 у клітинах і тканинах, і для спрямованого переносу лікарських засобів до первинних і метастатичних пухлин.

Поліпептиди RG1 можна застосовувати для стимуляції імунної відповіді на клітини, які містять RG1.

Полінуклеотиди, які кодують RG1, можна використовувати для діагностичних аналізів з метою виявлення рівнів полінуклеотидів, які кодують RG1, у клітинах і тканинах.

При станах, пов'язаних з експресією RG1, таких як рак передміхурової залози, може виявитися доцільним пригнічувати експресію або активність RG1. Експресію RG1 можна пригнічувати введенням антисмислових олігонуклеотидів або рибози-

мів. В іншому варіанті для лікування хвороб або станів, пов'язаних з активністю RG1, можна застосовувати антитіла, які специфічно розпізнають ділянки поліпептиду RG1, що відповідають за його активність.

Аналіз полінуклеотидів

Даний винахід стосується також застосування зв'язаних з rg1 полінуклеотидів для виявлення комплементарних полінуклеотидів, наприклад, як діагностичний реагент. Виявлення полінуклеотидів rg1, пов'язаних із хворобливим станом, може представляти собою інструмент для розвитку методів діагностики *in vitro* і *in vivo* діагностики, що можуть сприяти доповненню або уточненню діагнозу або виявлення наявності чутливості до захворювання, що є результатом тканинної специфічної експресії RG1.

За допомогою різних методик на рівні ДНК можна знайти індивідумів, що несуть мутації в гені, який кодує RG1. Зразки полінуклеотидів для діагностики можна одержувати з клітин пацієнта, наприклад, із крові, сечі, слини, матеріалу, одержаного за допомогою біопсії й аутопсії тканини. Для аналізу геному ДНК можна використовувати безпосередньо або після попередньої ферментативної ампліфікації за допомогою ПЛР [Saiki і ін., *Nature*, 324: 163-166, 1986]. Аналогічним чином можна застосовувати РНК або кДНК. Наприклад, ПЛР-праймери, комплементарні до полінуклеотидної послідовності, що кодує RG1, можна застосовувати для ідентифікації й аналізу експресії й мутацій rg1. Наприклад, делеції й інсерції можна знайти за зміною розміру ампліфікованого продукту в порівнянні з нормальним генотипом. Точкові мутації можна ідентифікувати за допомогою гібридизації ампліфікованої ДНК із радіоактивною РНК rg1 або в іншому варіанті за допомогою радіоактивно помічених антисмислових послідовностей ДНК. Точно співпадаючі послідовності можна відрізнити від помилково спарених дуплексів на основі розщеплення РНКазою А або за відмінностями у температурах плавлення.

Відмінності між послідовностями еталонних генів і генів, які мають мутації, також можуть бути виявлені шляхом безпосереднього секвенування ДНК. Крім того, клоновані сегменти ДНК можна застосовувати як зонди для виявлення специфічних сегментів ДНК. Чутливість таких методів можна істотно збільшити шляхом відповідного застосування ПЛР або іншого методу ампліфікації. Наприклад, праймери для секвенування застосовують у сполученні з дволанцюговим ПЛР-продуктом або одноланцюговою молекулою матриці, одержаної за допомогою модифікованої ПЛР. Визначення послідовності здійснюють за допомогою загальноприйнятих методик з використанням радіоактивно поміченого полінуклеотиду або шляхом процедур автоматичного секвенування з використанням флуоресцентних міток.

Генетичне тестування, засноване на відмінностях у послідовності ДНК, можна здійснювати шляхом виявлення зміни в електрофоретичній рухливості фрагментів ДНК у гелях з додаванням денатуруючих агентів або без них. Невеликі делеції й інсерції в послідовності можна візуалізувати за

допомогою гель-електрофорезу високого розділення. Відмінності між фрагментами ДНК різних послідовностей можна виявляти з використанням денатуруючих гелів у градієнті формаміду, на яких рухливість різних фрагментів ДНК сповільнюється в гелі в різних положеннях залежно від їх специфічної температури плавлення або часткової температури плавлення [див., наприклад, Myers і ін., *Science*, 230: 1242, 1985].

Заміни у певних ділянках послідовності можна виявляти за допомогою аналізів на основі захисту нуклеази, таких як захист від дії РНКаз і S1, або методом хімічного розщеплення [див., наприклад, Caton і ін., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401, 1985].

Так, виявлення специфічної послідовності ДНК можна здійснювати за допомогою таких методів, як гібридизація, захист РНКаз, хімічне розщеплення, безпосереднє секвенування ДНК або за допомогою рестриктаз (наприклад, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів ("ПДРФ") і Саузерн-блотинг геномної ДНК).

Крім використання найбільш розповсюджених методів гель-електрофорезу і секвенування ДНК мутації також можна виявляти шляхом аналізів *in situ*.

Аналізи поліпептидів

Даний винахід стосується також діагностичних аналізів, таких як кількісні і діагностичні аналізи для виявлення рівнів поліпептиду RG1 у клітинах і тканинах і загальній воді організму, включаючи визначення нормальних і аномальних рівнів. Так, наприклад, діагностичний аналіз за винаходом для виявлення понадекспресії поліпептиду RG1 у порівнянні зі зразками нормальної контрольної тканини можна застосовувати для виявлення наявності неоплазії, наприклад, раку передміхурової залози. Такі діагностичні тести можна також застосовувати для виявлення метастатичного росту пухлини. Методи аналізів, які можна використовувати для визначення рівнів поліпептиду, такого як поліпептид RG1 за даним винаходом, у зразку, взятому з організму хазяїна, добре відомі фахівцям у даній галузі. Такі методи аналізів включають радіоімунний аналіз (RIA), аналізи конкурентного зв'язування, Вестерн-блотинг і твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), а також аналіз з використанням клітинного сортера із збудженням флуоресценції (FACS). З цих методів часто переважним є ELISA. Метод ELISA включає початкове одержання антитіла, специфічного відносно RG1, переважно моноклонального антитіла. Крім того, як правило одержують репортерне антитіло, яке має здатність до зв'язування з моноклональним антитілом. Репортерне антитіло зв'язують з реагентом, що виявляється, таким як радіоактивний, флуоресцентний реагент або фермент, наприклад, пероксидаза з хрому.

Для здійснення ELISA зразок виділяють з хазяїна і інкубують на твердій основі, наприклад, полістироловому планшеті, яка зв'язує поліпептиди зразка. Усі вільні сайти зв'язування на планшеті потім сенсibiliзують (покривають) шляхом інкубації з неспецифічним протеїном, таким як бичачий сироватковий альбумін. Потім моноклональне ан-

титіло інкубують на планшеті, у цей час моноклональні антитіла зв'язуються з усіма поліпептидами RG1, що зв'язані з полістироловим планшетом. Незв'язане моноклональне антитіло відмивають буфером. Репортерне антитіло, зв'язане з пероксидазою із хрому, поміщають у планшет, що приводить до зв'язування репортерного антитіла з усіма моноклональними антитілами, зв'язаними з RG1. Неприєднане репортерне антитіло потім відмивають. Потім у планшет вносять реагенти для визначення пероксидазної активності, включаючи колориметричний субстрат. Імобілізована пероксидаза, зв'язана з RG1 через первинні і вторинні антитіла, утворює забарвлений продукт реакції. Кількість утвореного забарвленого продукту у визначений період часу свідчить про кількість поліпептиду RG1, що присутній у зразку. Кількісні дані, як правило, одержують шляхом порівняння зі стандартною кривою.

Можна застосовувати конкурентний аналіз, відповідно до якого антитіла, специфічні відносно RG1, зв'язують із твердою основою і мічений RG1 і зразок, одержаний з хазяїна, наносять на тверду основу, при цьому кількість виявленої мітки, приєднаної до твердої основи, може корелювати з кількістю RG1 у зразку.

Ці та інші аналізи описані серед іншого в Hampton і ін. [Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn, 1990] і в Maddox і ін. [J. Exp. Med., 158: 12111, 1983].

Антитіла

Винахід стосується також антитіл, які специфічно зв'язуються з RG1, які у контексті даного опису називають антитіла до RG1. Такі характеристики, як понадекспресія RG1 у тканинах передміхурової залози і його локалізація на клітинній поверхні, є прекрасним маркером для скринінгу, діагностики, прогнозу, наступних аналізів і візуалізації. Крім того, ці характеристики свідчать про те, що RG1 може представляти собою дуже гарну мішень для терапевтичних методів, таких як спрямована терапія з використанням антитіл, імунотерапія і генна терапія. У контексті даного опису поняття "специфічно зв'язується з" означає взаємодію антитіла і поліпептиду, причому взаємодія залежить від присутності певної структури (тобто антигенної детермінанти або епітопу) на поліпептиді; іншими словами, антитіло розпізнає і зв'язується зі специфічною структурою поліпептиду, а не з протеїнами в цілому.

Поліпептиди RG1, їх фрагменти або інші похідні або їх аналоги, або клітини, які експресують їх, можна використовувати як імуноген для одержання антитіл до них (Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1989)). Ці антитіла можуть, наприклад, представляти собою поліклональні або моноклональні антитіла. Даний винахід включає також химерні, одноланцюгові, гуманізовані і людські антитіла, а також їх Fab-фрагменти або продукти експресійної бібліотеки Fab. Пізні відомі в даній галузі методики можна застосовувати для одержання таких антитіл і фрагментів.

Антитіла до поліпептидів, які відповідають послідовності за даним винаходом, можна одержувати шляхом безпосередньої ін'єкції поліпептидів у

тварину або шляхом введення поліпептидів тварині, переважно крім людини. Одержане в такий спосіб антитіло потім повинне зв'язуватися із самими поліпептидами. При такому методі навіть послідовність, яка кодує лише фрагмент поліпептидів, можна застосовувати для одержання антитіл, які зв'язуються з повнорозмірними нативними поліпептидами. Такі антитіла потім можна застосовувати для виділення поліпептиду з тканини, у якій відбувається експресія поліпептиду.

Для одержання моноклональних антитіл можна застосовувати будь-які методики, які забезпечують вироблення антитіл безперервними культурами ліній клітин. Приклади включають метод, заснований на використанні гібридом [Kohler і Milstein, Nature, 256: 495-497, 1975], метод, заснований на використанні людських В-клітинних гібридом [Kozbor і ін., Immunology Today, 4:72, 1983] і метод, заснований на застосуванні EBV-гібридом, для одержання людських моноклональних антитіл [Cole і ін., у: Monoclonal Antibodies and Cancer, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985].

Крім того, можна застосовувати методики, призначені для одержання "химерних антитіл", сплайсингу генів мишиних антитіл з генами людських антитіл з одержанням молекули з відповідною антигенною специфічністю і біологічною активністю [Morrisson і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855, 1984; Neuberger і ін., Nature, 312: 604-608, 1984; Takeda і ін., Nature, 314: 452-454, 1985]. В альтернативному варіанті методики, описані для одержання одноланцюгових антитіл [патент США 4946778], можна адаптувати для вироблення RG1-специфічних одноланцюгових антитіл.

Крім того, "людські" антитіла можна одержувати за допомогою методів, описаних в [патентах США 5877397 і 5569825], які повністю включені в даний опис як посилання.

Антитіла можна також одержувати, індукуючи утворення *in vivo* у популяції лімфоцитів, або шляхом скринінгу бібліотек або панелей рекомбінантних імуноглобулінів з використанням реагентів з високою специфічністю зв'язування відповідно до методу, описаному в Orlandi і ін. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 3833-3837, 1989] і в Winter і Milstein [Nature, 349: 293-299, 1991].

Також можна одержувати фрагменти антитіл, які містять специфічні зв'язувальні RG1 сайти. Наприклад, такі фрагменти включають (але не обмежуючись ними) P(ab')₂-фрагменти, які можна одержувати розщепленням пепсином молекули антитіла, і Fab-фрагменти, які можна одержувати відновленням дисульфідних містків P(ab')₂-фрагментів. В альтернативному варіанті можна конструювати експресійні бібліотеки Fab, які дозволяють швидко і легко ідентифікувати моноклональні Fab-фрагменти, які мають необхідну специфічність [Huse і ін., Science, 256: 1270-1281, 1989].

Амінокислотну послідовність RG1, представлену в даному описі, можна застосовувати для вибору специфічних ділянок поліпептиду RG1 з метою одержання антитіл. Як повинно бути очевидно фахівцям, ділянки або епітопи поліпептиду RG1, до яких спрямоване антитіло, можуть зміню-

ватися залежно від передбачуваного застосування. Наприклад, антитіла, призначені для застосування в імуноаналізі для виявлення зв'язаного з мембраною RG1 на поверхні клітин передміхурової залози, повинні зв'язуватися з доступними епітопами на поліпептиді RG1. Ділянки поліпептиду RG1, які мають імуногенну структуру, а також інші ділянки і домени легко можна ідентифікувати за допомогою різних інших методів, відомих у даній галузі, таких як аналізи Chou-Fasman, Garnier-Robson або Jameson-Wolf. Фрагменти, які містять ці залишки, найбільш придатні для одержання антитіл до RG1. Особливо цінні в цьому плані фрагменти включають (але не обмежуючись ними) послідовність PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8); HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10);

DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO: 11); і NEIVDSASVPET (SEQ ID NO: 12). Одержання поліклональних антитіл до цих ділянок описано в прикладі 4.

Антитіла до RG1 за винаходом можуть бути особливо цінними для діагностичних аналізів, методів візуалізації і терапевтичних методів, спрямованих на регулювання раку передміхурової залози. Винахід стосується різних імунологічних аналізів, які можна застосовувати для виявлення поліпептидів RG1 і для діагностики раку передміхурової залози. Для таких аналізів, як правило, застосовують одне або декілька антитіл до RG1, які мають здатність розпізнавати і зв'язуватися з поліпептидом RG1. Найбільш переважні антитіла повинні вибірково зв'язуватися з RG1 і не повинні зв'язуватися (або слабо зв'язуватися) з поліпептидами, які не належать до RG1. Аналізи включають різні формати імунологічних аналізів, які добре відомі в даній галузі, включаючи (але не обмежуючись ними) різні типи радіоімуноаналізів, твердофазні імуноферментні аналізи і т.п. Крім того, винахід також стосується методів імунологічної візуалізації, за допомогою яких можна знайти рак передміхурової залози, включаючи (але не обмежуючись ними) методи радіосцинтиграфічної візуалізації, засновані на використанні мічених антитіл до RG1. Такі аналізи можуть застосовуватися в клінічних умовах для виявлення, моніторингу і прогнозу раку передміхурової залози.

Описані вище антитіла можна застосовувати для виділення або ідентифікації клонів, які експресують поліпептид, або для очищення поліпептиду за даним винаходом шляхом прикріплення антитіла до твердої основи для виділення і/або очищення за допомогою афінної хроматографії.

Крім того, антитіла до RG1 можна застосовувати для виділення RG1-позитивних клітин за допомогою методів сортування й очищення клітин. Зокрема, антитіла до RG1 можна застосовувати для виділення клітин раку передміхурової залози з ксенотрансплантатів пухлинної тканини, із клітин у культурі і т.д. з використанням заснованих на застосуванні антитіл методів сортування або очищення клітин за допомогою афінної хроматографії. Інші варіанти застосування антитіл до RG1 за винаходом включають одержання антиідіотипічних антитіл, які імітують поліпептид RG1.

Антитіла до RG1 можна застосовувати для виявлення присутності раку передміхурової залози або метастазів пухлини. Присутність таких клітин, які містять RG1, у різних біологічних зразках, включаючи сироватку, одержані за допомогою біопсії зразки передміхурової залози або інших тканин, можна виявляти за допомогою антитіл до RG1. Крім того, антитіла до RG1 можна застосовувати для різних методів візуалізації, таких як імуносцинтиграфія з використанням Tc-99m (або іншого ізотопу), кон'югованого з антитілом. Наприклад, для виявлення рекурентних і метастатичних карцином передміхурової залози можна використовувати протокол візуалізації, аналогічний до недавно описаного, який заснований на застосуванні In-111, кон'югованого з антитілом до специфічного для передміхурової залози мембранного антигену (PSMA) [Sodee і ін., Clin. Nuc. Med., 21: 759-766, 1997].

Антитіла до RG1 за винаходом можна мітити за допомогою маркера, що виявляється, або їх можна кон'югувати із другою молекулою, такою як цитотоксичний агент, і застосовувати для спрямованого переносу другої молекули в RG1-позитивні клітини [Vitetta E.S. і ін., у: Immunotoxin Therapy, ред. DeVita Jr. V.T. і ін., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4-е вид., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993]. Приклади цитотоксичних агентів включають (але не обмежуючись ними) рицин, доксорубіцин, даунорубіцин, таксол, бромід етидію, митоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, дигідроксінтрацидін, актиноміцин D, дифтерійний токсин, екзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин і глюкокортикоїд, та інші хіміотерапевтичні агенти, а також радіоактивні ізотопи. Прийнятні маркери, що виявляються, включають (але не обмежуючись ними) радіоактивний ізотоп, флуоресцентну сполуку, біоломінісцентну сполуку, хемілюмінісцентну сполуку, металевий хелатор або фермент. Прийнятні радіоактивні ізотопи включають такі: сурма-124, сурма-125, миш'як-74, барій-103, барій-140, берилій-7, вісмут-206, вісмут-207, кадмій-109, кадмій-115m, кальцій-45, церій-139, церій-141, церій-144, цезій-137, хром-51, кобальт-56, кобальт-57, кобальт-58, кобальт-60, кобальт-64, ербій-169, європій-152, гадоліній-153, золото-195, золото-199, гафній-175, гафній-181, індій-111, йод-123, йод-131, іридій-192, залізо-55, залізо-59, криптон-85, свинець-210, марганець-54, ртуть-197, ртуть-203, молибден-99, неодим-147, нептуній-237, нікель-63, ніобій-95, осмій-185+191, паладій-103, платина-195m, празеодим-143, прометій-147, протактиній-233, радій-226, реній-186, рубідій-86, рутеній-103, рутеній-106, скандій-44, скандій-46, селен-75, срібло-110m, срібло-111, натрій-22, стронцій-85, стронцій-89, стронцій-90, сірка-35, тантал-185, технецій-99m, телур-125, телур-132, талій-170, талій-204, торій-228, торій-232, олово-113, титан-44, вольфрам-185, ванадій-48, ванадій-49, ітербій-169, ітрій-88, ітрій-90, ітрій-91, цинк-65 і цирконій-95.

Імунотерапія раку передміхурової залози

Винахід стосується різних імунотерапевтичних методів, призначених для лікування раку передміхурової залози, включаючи терапію з використан-

ням антитіл, вакцинацію *in vivo* і імунотерапевтичні підходи для лікування *ex vivo*. Відповідно до одного з варіантів винахід стосується антитіл до RG1, які можна застосовувати системно для лікування раку передміхурової залози. Наприклад некон'юговані антитіла до RG1 можна вводити пацієнту таким чином, що антитіло зв'язується з RG1 на поверхні, всередині пухлинних клітин передміхурової залози або асоціюється з цими клітинами й опосередковує руйнування клітин і пухлини за допомогою механізмів, що можуть включати опосередкований комплементом цитолізис, залежну від антитіла клітинну цитотоксичність, зміну фізіологічної функції RG1 і/або інгібування зв'язування лігандів або шляхів трансдукції сигналів. Антитіла до RG1, кон'юговані з токсичними агентами, такими як рицин або радіоактивні ізотопи, також можна застосовувати при терапії для введення токсичного агента безпосередньо в пухлинні клітини передміхурової залози, що несуть RG1, тим самим руйнуючи пухлинні клітини.

Імунотерапію раку передміхурової залози з використанням антитіл до RG1 можна здійснювати відповідно до різних підходів, що з успіхом застосовувалися відносно інших типів раку, які включають (але не обмежуючись ними) рак ободової кишки [Aden і ін., *Crit. Rev. Immunol.*, 18: 133-138, 1998], мезенхімний мієлому [Ozaki і ін., *Blood*, 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari і ін., *Blood*, 90: 2437-2444, 1997], рак шлунка [Kasprzyk і ін., *Cancer Res.*, 52: 2771-2776, 1992], В-клітинну лімфому [Funakoshi і ін., *Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19: 93-101, 1996], лейкоз [Zhong і ін., *Leuk. Res.*, 20: 581-589, 1996], колоректальний рак [Moun і ін., *Cancer Res.*, 54: 6160-6166, 1994; Velders і ін., *Cancer Res.*, 55: 4398-4403, 1995] і рак молочної залози [Shepard і ін., *J. Clin. Immunol.*, 11: 117-127, 1991].

Винахід стосується також вакцин, до складу яких входить поліпептид RG1 або його фрагмент. Застосування пухлинного антигену у вакцині для одержання гуморального й опосередкованого клітиною імунітету для протиракової терапії добре відомо в даній галузі і раніше знайшло застосування при раку передміхурової залози з використанням як імуногенів людського PSMA і PAP гризунів [Hodge і ін., *Int. J. Cancer*, 63:231-237, 1995; Fong і ін., *J. Immunol.*, 159: 3113-3117, 1997]. Такі методи можна легко адаптувати на практиці для використання поліпептиду RG1 або його фрагмента або молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує RG1, і рекомбінантного вектора, який має здатність експресувати і відповідним чином презентувати імуноген RG1.

Наприклад, для введення молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує RG1, можна застосовувати системи, засновані на використанні вірусних генів. Різні системи введення, засновані на використанні вірусних генів, які можна застосовувати для практичного втілення даного винаходу, включають (але не обмежуючись ними) віруси коров'ячої віспи, віспи свійських птахів, віспи канарок, аденовірус, вірус грипу, поліовірус, аденоасоційований вірус, лентівірус і синдбус-вірус [Restifo у: *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 658-663, 1996]. Також можна застосо-

увати невірусні системи введення з використанням "оголеної" ДНК, яка кодує поліпептид RG1, або його фрагмент, яку вводять пацієнту (тобто внутрішньом'язово) для того, щоб індукувати протипухлинну відповідь. Відповідно до одного з варіантів можна застосовувати повнорозмірну людську кДНК rg1. Відповідно до іншого варіанта можна застосовувати фрагменти людської кДНК rg1. Згідно із ще одним варіантом можна застосовувати молекули нуклеїнової кислоти rg1, які кодують специфічні епітопи Т-лімфоцитів (цитотоксичні лімфокіни, CTL). CTL-епітопи можна виявляти з використанням певних алгоритмів (наприклад, Epimer, Brown University), що дозволяють ідентифікувати пептиди в поліпептиді RG1, які мають здатність оптимально зв'язуватися зі специфічними алелями головного комплексу гістосумісності людини (HLA).

Також можна використовувати різні стратегії *ex vivo*. Один з підходів включає застосування дендритних клітин для презентації поліпептиду RG1 імунній системі пацієнта як антиген. Дендритні клітини експресують молекули класу I і II МНС (головний комплекс гістосумісності), В7-костимулятор і IL-12, і внаслідок цього вони є високо спеціалізованими антигенпрезентуючими клітинами. При раку передміхурової залози аутологічні дендритні клітини, які запускаються пептидами специфічного для передміхурової залози мембранного антигену (PSMA), застосовують на фазі I клінічного досліді для стимулювання імунної системи пацієнтів, що страждають від раку передміхурової залози [Tjoa і ін., *Prostate*, 28: 65-69, 1996; Murphy і ін., *Prostate*, 29: 371-380, 1996]. Дендритні клітини можна використовувати для презентації поліпептидів RG1 Т-клітинам у контексті молекул класу I і II МНС. Відповідно до одного з варіантів здійснення аутологічних дендритні клітини запускають за допомогою поліпептидів RG1, що мають здатність зв'язуватися з молекулами МНС. Відповідно до іншого варіанта здійснення дендритні клітини запускають за допомогою повнорозмірного поліпептиду RG1. Згідно із ще одним варіантом здійснення в дендритних клітинах створюють понадекспресію гена rg1 з використанням різних векторів, що забезпечують вирішення задачі, добре відомих у даній галузі, таких як аденовірус [Arthur і ін., *Cancer Gene Ther.*, 4: 17-25, 1997], ретровірус [Henderson і ін., *Cancer Res.*, 56: 3763-3770, 1996], лентівірус, аденоасоційований вірус, трансфекції ДНК [Ribas і ін., *Cancer Res.*, 57: 2865-2869, 1997] і трансфекції одержаної з пухлини РНК [Ashley і ін., *J. Exp. Med.*, 186: 1177-1182, 1997].

Антиідіотипічні антитіла до RG1 також можна використовувати для протиракової терапії у вигляді вакцини для індукції імунної відповіді на клітини, які експресують поліпептид RG1. Зокрема, одержання антиідіотипічних антитіл добре відомо в даній галузі, і ці методи легко адаптувати для одержання антиідіотипічних антитіл до RG1, що імітують епітоп на поліпептиді RG1 [див, наприклад, Wagner і ін., *Hybridoma*, 16: 33-40, 1997; Foon і ін., *J. Clin. Invest.*, 96: 334-342, 1995; Herlyn і ін., *Cancer Immunol Immunother.*, 43: 65-76, 1996]. Таке антиідіотипічне антитіло можна застосовувати для

антиідіотипічної терапії, як це в даний час застосовується на практиці з використанням інших антиідіотипічних антитіл до пухлинних антигенів.

Методи генетичної імунізації можна застосовувати для одержання профілактичних або терапевтичних гуморальних і клітинних імунних відповідей на ракові клітини, що експресують RG1. З використанням описаних вище молекул ДНК конструкції, які кодують RG1, що містять ДНК, яка кодує поліпептид/імуноген RG1 і відповідні регуляторні послідовності, можна ін'єкувати безпосередньо в м'яз або шкіру індивідуума, у результаті чого клітини м'яза або шкіри одержують конструкцію і експресують кодований поліпептид/імуноген RG1. Поліпептид/імуноген RG1 може експресуватися у вигляді поліпептиду клітинної поверхні або секретуватися. Експресія поліпептиду/імуногена RG1 приводить до одержання профілактичного або терапевтичного гуморального і клітинного імунітету до раку передміхурової залози. Можна застосовувати різні профілактичні і терапевтичні методи генетичної імунізації, відомі в даній галузі (для узагальнення даних див. інформацію і посилання, опубліковані на сайті Інтернету www.genweb.com).

Антисмислові олігонуклеотиди, антисмислові вектори і рибозими

Антисмислові полінуклеотиди, комплементарні до rg1, можна одержувати синтетичним шляхом. Такі олігонуклеотиди можна вводити в клітини за допомогою ліпідів, які сприяють проникненню антисмислових олігонуклеотидів у клітини, або без них.

В альтернативному варіанті експресійні вектори, одержані з ретровірусу, аденовірусу, вірусу герпеса простого або вірусу коров'ячої віспи або з різних бактеріальних плазмід, можна застосовувати для конструювання і введення рекомбінантних векторів, які можуть експресувати антисмисловий rg1, (див., наприклад, методи, описані в Sambrook і ін., (вище) і в Ausubel і ін., (вище)).

Полінуклеотиди, що включають повнорозмірну послідовність кДНК і/або регуляторні елементи, дають можливість дослідникам застосовувати полінуклеотиди rg1 як інструмент для вивчення смислових ланцюгів [Youssofian і Lodish, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 98-104, 1993] або антисмислових ланцюгів [Eguchi і ін., *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 631-652, 1991] з метою регуляції функції гена. Такий метод добре відомий у даній галузі і смислові або антисмислові олігомери або більш великі фрагменти можна конструювати з різних ділянок, які знаходяться на кодувальних або контролюючих ділянках.

Гени, які кодують RG1, можна виключати шляхом трансфекції клітини або тканини експресійними векторами, для яких характерні високі рівні експресії потрібного фрагмента полінуклеотиду rg1. Такі конструкції можуть підвищувати в клітинах кількість нетрансльованих смислових або антисмислових послідовностей. Навіть у відсутності інтеграції в ДНК такі вектори можуть продовжувати транскрибувати молекули РНК доти, поки всі копії не будуть знищені ендогенними нуклеазами. Короточасна експресія може продовжуватися в векторі, який не реплікується, протягом місяця або бі-

льше і навіть протягом ще більш тривалого терміну, якщо відповідні елементи реплікації входять до складу векторної системи.

Як відзначалося раніше, модифікацію експресії гена можна одержати шляхом створення антисмислових молекул, ДНК або РНК для контролюючих ділянок rg1, тобто промоторів, енхансерів і інтронів. Олігонуклеотиди, одержані із сайту ініціації транскрипції, наприклад, з ділянок, які розташовані від -10 до +10 пар основ лідерної послідовності, є переважними. Антисмислові молекули також можна конструювати з метою блокади трансляції мРНК, перешкоджаючи зв'язку транскрипту з рибосомами. Аналогічно до цього, інгібування може бути досягнуте за допомогою методики "триспірального" старювання основ. Триспіральне спарювання погіршує здатність подвійної спіралі відкриватися в достатньому ступені для зв'язування з полімеразами, факторами транскрипції або регуляторними молекулами. Сучасні успішні терапевтичні підходи, засновані на використанні триланцюгової ДНК узагальнені в Gee J.E. із співавторами [y. Hurber і Car, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994].

Рибозими представляють собою молекули РНК, що мають ферментативну активність, які можуть каталізувати специфічне розщеплення РНК [патент US 4987071; WO 93/23057]. Механізм дії рибозиму включає специфічну для послідовності гібридизацію молекули рибозиму з комплементарною РНК-мішенню з наступним ендонуклеолітичним розщепленням. Під обсяг винаходу підпадають сконструйовані, які несуть мотив у вигляді молотоподібної голівки, молекули рибозиму, які можуть специфічно й ефективно каталізувати ендонуклеолітичне розщеплення РНК, яка кодує RG1. Специфічні сайти розщеплення рибозимом на будь-якій потенційній РНК-мішені спочатку ідентифікують за допомогою сканування молекули-мішені відносно сайтів розщеплення рибозимом, що включають такі послідовності: GUA, GUU і GUC. Після ідентифікації короткі послідовності РНК довжиною від 15 до 20 рибонуклеотидів, що відповідають ділянці гена-мішені, яка містить сайт розщеплення, можна оцінити відносно особливостей вторинної структури, що можуть зробити олігонуклеотид неоперабельним. Придатність вибраних мішеней також можна оцінити шляхом визначення можливості гібридизації з комплементарними олігонуклеотидами за допомогою аналізів, заснованих на захисті від рибонуклеази [Irie і ін., *Advance. Pharmacol.*, 40: 207-257, 1997].

Антисмислові молекули і рибозими за винаходом можна одержувати за допомогою будь-якого методу, застосовуваного в даній галузі для синтезу молекул РНК. Ці методики включають хімічний синтез олігонуклеотидів, такий як твердофазний фосфорамідитний хімічний синтез. В альтернативному варіанті молекули РНК можна одержувати шляхом транскрипції *in vitro* і *in vivo* або з використанням послідовностей ДНК, які кодують RG1. Такі послідовності ДНК можна включати в широку різноманітність векторів із прийнятними для РНК-полімерази промоторами, таким як T7 або SP6. В

альтернативному варіанті в лінії клітин, клітини або тканини можна інтродукувати антисмислові конструкції кДНК, які синтезують антисмислову РНК конститутивно або індукційно.

Молекули РНК можна модифікувати з метою підвищення внутрішньоклітинної стабільності і часу напівжиття. Можливі модифікації включають (але не обмежуючись ними) додавання фланкуючих послідовностей на 5'- і/або 3'-кінці молекул або застосування фосфоріації або 2'-О-метилу замість фосфодіестеразних зв'язків у каркасі молекули. Підвищену стабільність також можна одержувати шляхом включення нетрадиційних основ, таких як інозит і квеозин, а також ацетил-, метил-, тіо- і аналогічним чином модифікованих форм аденіну, цитидину, гуаніну, тимідину й уридину, які важко розпізнаються ендogenousними ендонуклеазами.

Методи інтродукції антисмислових векторів у клітини і тканини включають описані вище й аналогічні до них методи, які можна застосовувати для терапії *in vivo*, *in vitro* і *ex vivo*. Для терапії *ex vivo* антисмислові вектори інтродукують у клітини, взяті в пацієнта, і розмножують клонуванням з метою зворотної аутологічної трансплантації цьому ж пацієнту, як це описано в [патентах США 5399493 і 5437994], що включені в даний опис як посилання. Введення шляхом трансфекції і за допомогою ліпосом або інших агентів, основою яких є або не є ліпіди, добре відомо в даній галузі.

Аналізи з метою виявлення агентів, які зв'язуються з RG1

Даний винахід стосується також аналізів і способів, які можна застосовувати для ідентифікації агентів, які зв'язуються з RG1. Зокрема, агенти, які зв'язуються з RG1, можна виявляти за здатністю ліганду до RG1 або іншого агента або його складового зв'язуватися з RG1 і/або за їх здатністю інгібувати/стимулювати активність RG1.

В альтернативному варіанті агенти, які зв'язуються з поліпептидом RG1, можна виявляти за допомогою двогібридної системи на основі дріжджів або з використанням аналізу захоплення зв'язування. При використанні двогібридної системи на основі дріжджів одну одиницю експресії, яка кодує злитий протеїн, що включає одну з двох субодиниць фактора транскрипції і поліпептиду RG1, інтродукують і експресують у клітині дріжджів. Клітину додатково модифікують так, щоб вона включала (1) одиницю експресії, яка кодує маркер, що виявляється, для експресії якого необхідні дві субодиниці фактору транскрипції, і (2) одиницю експресії, яка кодує злитий протеїн, що складається з другої субодиниці фактора транскрипції і клонованого сегмента ДНК. Якщо клонований сегмент ДНК кодує протеїн, який зв'язується з поліпептидом RG1, то експресія приводить до взаємодії RG1 і кодованого протеїну. Це приводить до тісної взаємодії двох одиниць фактора транскрипції, що дозволяє відновити фактор транскрипції. Це приводить до експресії маркера, що виявляється. Використання двогібридної системи на основі дріжджів особливо цінно для скринінгу бібліотеки кДНК, що кодує сегменти партнерів RG1 для клітинного зв'язування.

Поліпептиди RG1, які можна застосовувати у вищевказаних аналізах, включають (але не обмежуючись ними) виділений поліпептид RG1, фрагмент поліпептиду RG1, клітину, яка була змінена з метою експресії поліпептиду RG1, або фракцію клітини, яка була змінена з метою експресії поліпептиду RG1. Крім того, поліпептид RG1 може представляти собою повнорозмірний поліпептид або визначений фрагмент поліпептиду RG1. Фахівцю в даній галузі повинно бути очевидно, що якщо поліпептид RG1, можна застосовувати в цьому аналізі для виявлення агентів, які зв'язуються з ним, наприклад, на основі оцінки зміни молекулярної маси або активності, то можна використовувати описаний метод аналізу.

Метод, застосовуваний для з'ясування того, чи зв'язується агент/клітинний компонент із поліпептидом RG1, насамперед повинен базуватися на природі використовуваного поліпептиду RG1. Наприклад, аналіз на сповільнення рухливості в гелі можна використовувати для визначення того, чи зв'язується агент із RG1 або його фрагментом. В альтернативному варіанті імунологічний аналіз і аналіз з використанням біочіпу можна адаптувати для застосування з поліпептидом RG1. Фахівець може легко застосувати різні відомі в даній галузі методики для визначення того, чи зв'язується конкретний агент із поліпептидом RG1.

Агенти і клітинні компоненти також можна оцінювати відносно їх здатності модулювати активність поліпептиду RG1 за допомогою аналізу з використанням безклітинної системи або аналізу за допомогою клітинної системи. У міру того, як активності поліпептиду RG1 стають більш вираженими, можна застосовувати функціональні аналізи, засновані на визначенні активності.

У контексті даного опису вважається, що агент антагонізує активність RG1, коли агент знижує активність RG1. Переважний антагоніст повинен вибірково антагонізувати RG1, не впливаючи на будь-які інші клітинні протеїни. Крім того, переважний антагоніст повинен знижувати активність RG1 більше ніж на 50%, більш переважно більш ніж на 90%, найбільш переважно повністю інгібувати активність RG1.

Агенти, які аналізують за допомогою описаного вище методу, можна відбирати випадковим чином (довільно) або відбирати цілеспрямовано або конструювати. У контексті даного опису вважається, що агент вибирають випадковим чином, коли агент вибирають довільно без урахування специфічних послідовностей поліпептиду RG1. Прикладом джерел для довільного вибору агентів є банки хімічних сполук або пептидна комбінаторна бібліотека або бульйон для вирощування організму або рослинний екстракт.

У контексті даного опису вважається, що агент відбирають цілеспрямовано або конструюють, коли агент вибирають на не випадковій основі, беручи до уваги послідовність сайта-мішені/або його конформацію, зв'язану з активністю агента. Агенти можна цілеспрямовано відбирати або цілеспрямовано конструювати за допомогою пептидних послідовностей, з яких складається поліпептид RG1. Наприклад, цілеспрямовано відібраний пептидний

агент може представляти собою пептид, амінокислотна послідовність якого ідентична до амінокислотної послідовності фрагмента поліпептиду RG1.

Агенти, які аналізують за допомогою описаних вище методів, можуть представляти собою, наприклад, пептиди, антитіла, олігонуклеотиди, невеликі молекули й похідні вітамінів, а також вуглеводи. Фахівцям у даній галузі повинно бути очевидно, що для агентів, застосовуваних у даному методі скринінгу, не існує обмежень, пов'язаних зі структурними особливостями. Одним із класів агентів за винаходом є пептидні агенти, амінокислотні послідовності яких вибирають з урахуванням амінокислотної послідовності поліпептиду RG1.

Пептидні агенти можна одержувати за допомогою стандартних методів твердофазного (або рідкофазного) синтезу пептидів, які відомі в даній галузі. Крім того, ДНК, яка кодує ці пептиди, можна синтезувати за допомогою наявного в продажі інструментарію для синтезу олігонуклеотидів і одержувати методом рекомбінації з використанням систем для одержання рекомбінантів. Одержання з використанням твердофазного синтезу пептидів є необхідним, якщо потрібно включити амінокислоти, які не кодуються геном.

Ще одним класом агентів за даним винаходом є антитіла, імунореактивні відносно положень поліпептиду RG1, що мають вирішальне значення. Як обговорювалося вище, антитіла одержують імунізацією прийнятних ссавців пептидами, які містять антигенні ділянки, ті ділянки поліпептиду RG1, які повинні представляти собою мішені для антитіл. Такі агенти можна застосовувати для аналізів конкурентного зв'язування при ідентифікації другого покоління інгібувальних агентів, а також для блокади активності RG1.

Клітинні екстракти, що аналізують за допомогою методів за даним винаходом, можуть представляти собою, наприклад водні екстракти клітин або тканин, органічні екстракти клітин або тканин або частково очищені клітинні фракції. Фахівцям у даній галузі повинно бути очевидно, що не існує обмежень, пов'язаних із джерелом клітинного екстракту, застосовуваного для методу скринінгу за даним винаходом.

Агенти, які зв'язуються з поліпептидом RG1, такі як антитіла до RG1, можна застосовувати для модуляції активності RG1, для спрямованого переносу протиракового агента до відповідних клітин ссавців або для виявлення агентів, які блокують взаємодію з RG1. Клітини, які експресують RG1, можна направляти або ідентифікувати за допомогою агентів, які зв'язуються з RG1.

Метод застосування агентів, які зв'язуються з RG1, залежить від природи агента, який зв'язується з RG1. Наприклад, агент, який зв'язується з RG1, можна застосовувати для переносу кон'югованих токсинів, таких як дифтерійний токсин, холерний токсин, рицин або екзотоксин *Pseudomonas*, у клітину, яка експресує RG1; модуляції активності RG1; для цілеспрямованого знищення клітини, яка експресує RG1; або для скринінгу з метою виявлення агентів для конкурентного зв'язування. Наприклад, агент, який інгібує RG1, можна застосовувати для безпосереднього інгібу-

вання росту клітин, які експресують RG1, у той час як агент, який зв'язується з RG1, можна використовувати як агент для діагностики.

Фармацевтичні композиції і шляхи введення
Даний винахід стосується також фармацевтичних композицій, які можуть включати поліпептиди rg1, поліпептиди RG1, антитіла, агоністи, антагоністи або інгібітори індивідуально або в сполученні принаймні з одним іншим агентом, таким як стабілізатор, які можна вводити в будь-якому стерильному біосумісному фармацевтичному носії, включаючи (але не обмежуючись ними) фізіологічний розчин, забуферений фізіологічний розчин, декстрозу і воду. Будь-які з вказаних молекул можна вводити пацієнту індивідуально або в сполученні з іншими агентами, лікарськими засобами або гормонами, які у фармацевтичних композиціях змішують з ексципієнтами(ами) або фармацевтично прийнятними носіями. Відповідно до одного з варіантів здійснення даного винаходу фармацевтично прийнятний носій є фармацевтично інертним.

Даний винахід стосується також шляхів введення фармацевтичних композицій. Введення здійснюють перорально або парентерально. Парентеральне введення включає місцеве, внутрішньоартеріальне (безпосередньо в пухлину), внутрішньом'язове, підшкірне, інтрамедулярне, внутрішньоотрахеальне, інтравентрикулярне, внутрішньовенне, внутрішньоочеревинне або інтраназальне введення. Крім діючих речовин ці фармацевтичні композиції можуть містити придатні фармацевтично прийнятні носії, включаючи ексципієнти і допоміжні речовини, які полегшують приготування препаратів на основі діючих речовин, які можна застосовувати у фармацевтиці. Додаткові деталі методів приготування і введення можна знайти в останньому виданні Remington's Pharmaceutical Science [вид. Maack Publishing Co., Easton Pa].

Фармацевтичні композиції для перорального введення можна виготовляти з використанням добре відомих у даній галузі носіїв у вигляді дозованих форм, придатних для перорального введення. Такі носії дозволяють виготовляти фармацевтичні композиції у вигляді таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, суспензій і т.п., призначених для прийому всередину пацієнтами.

Фармацевтичні препарати для перорального введення можна одержувати об'єднанням діючих речовин із твердим ексципієнтом, необов'язково подрібненням утвореної суміші і обробкою суміші гранул після додавання при необхідності прийнятних допоміжних речовин з одержанням ядер таблеток або драже. Прийнятні ексципієнти включають вуглеводні або протеїнові наповнювачі, такі як цукри, включаючи лактозу, сахарозу, маніт або сорбіт; крохмаль, одержаний з кукурудзи, пшениці, рису, картоплі або інших рослин; целюлозу, таку як метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза або карбоксиметилцелюлоза натрію; і камеді, включаючи гуміарабік і трагакант; і протеїни, такі як желатин і колаген. При необхідності можна додавати розпушувачі або солубілізатори, такі як

зшитий полівінілпіролідон, агар, альгінова кислота та її солі, такі як альгінат натрію.

На ядра драже наносять прийнятні покриття, такі як концентровані цукрові розчини, які можуть також включати гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, гелеутворюючий агент карбопол, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, розчини лаку і прийнятні органічні розчинники або суміші розчинників. У покриття таблеток або драже також можна додати барвники або пігменти з метою ідентифікації або для характеристик кількості діючої речовини у дозованій формі.

Фармацевтичні препарати, які можна застосовувати перорально, включають капсули, що легко проковтуються, виготовлені з желатину, а також м'які запечатані капсули, виготовлені з желатину і які мають покриття з гліцерину або сорбіту. Капсули, що легко проковтуються, можуть містити діючі речовини в суміші з наповнювачем або зв'язувальними речовинами, таким як лактоза або крохмалі, замаслювачами, такими як тальк або стеарат магнію, і необов'язково стабілізаторами. У м'яких капсулах діючі речовини можна розчинити або суспендувати у прийнятних рідинах, таких як жирні олії, вазелін або рідкий поліетиленгліколь, з додаванням стабілізаторів або без них.

Фармацевтичні композиції для парентерально-го введення включають водні розчини діючих речовин. Для ін'єкції фармацевтичні композиції за винаходом можна готувати у водних розчинах, переважно у фізіологічних прийнятних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або забуферений фосфатом фізіологічний розчин. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії, такі як карбоксиметилцелюлоза натрію, сорбіт або декстран. Крім того, суспензії діючих речовин можна одержувати у вигляді відповідних масляних суспензій для ін'єкцій. Прийнятні ліпофільні розчинники або носії включають жирні олії, такі як кунжутна олія, або синтетичні ефіри жирних кислот, такі як етилолеат або тригліцериди, або ліпосоми. Необов'язково суспензія може також включати прийнятні стабілізатори або агенти, які підвищують розчинність сполук, що дозволяє одержувати високо концентровані розчини.

Для місцевого або назального застосування в композиції використовують змочувальні (які збільшують проникнення) речовини, що відповідають конкретному бар'єру, через який необхідно проникнути. Такі змочувальні речовини добре відомі в даній галузі.

Набори

Винахід стосується також фармацевтичних упаковок і наборів, які містять один або декілька контейнерів, що включають один або декілька інгредієнтів описаних вище композицій за винаходом. Застосовувані в наборі такий(і) контейнер(и) повинний(ні) задовольняти законодавчим вимогам, які регулюють виробництво, застосування або продаж фармацевтичних або біологічних продуктів, які затверджені установою, уповноваженою здійснювати контроль за виробництвом, застосуванням і продажем продуктів, які можна вводити людям.

Виробництво і зберігання

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можна виготовляти добре відомим методом, наприклад, за допомогою загальноприйнятих процесів змішування, розчинення, грануляції, виготовлення драже, розтирання в порошок, емульгування, капсулювання, уловлювання або ліофілізації.

Фармацевтичні композиції можна одержувати у вигляді солі і можна готувати додаванням кислот, які включають (але не обмежуючись ними) соляну, сірчану, оцтову, молочну, винну, яблучну, янтарну кислоту й ін. Солі потенційно є більш розчинними у водному та інших протонних розчинниках, ніж відповідні форми у вигляді вільних основ. В інших випадках переважний препарат може представляти собою ліофілізований порошок у 1-5мМ розчині гістидину, 0,1-2%-ному розчині сахарози, 2-7%-ному розчині маніту при pH4,5-5,5, які перед застосуванням об'єднують з буфером.

Після приготування фармацевтичних композицій, які включають діючу речовину за винаходом в прийнятному носії, їх можна поміщати у відповідний контейнер і прикріплювати етикеткою з зазначенням схеми лікування конкретного стану. Для введення RG1 така етикетка повинна містити дані про кількість, частоту та шлях введення.

Терапевтично ефективна доза

Фармацевтичні композиції, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, включають композиції, у яких діюча речовина присутня в ефективній кількості для досягнення поставленої мети, тобто лікування певного хворобливого стану, для якого характерна експресія RG1. Визначення ефективної дози знаходиться в компетенції фахівців у даній галузі.

Для будь-якої сполуки терапевтично ефективну дозу можна спочатку визначати або за допомогою тестів на культурах клітин, наприклад, неопластичних клітин, або з використанням як моделі тварин, як правило, мишей, кроликів, собак або свиней. Моделювання на тваринах також застосовують для оцінки необхідного діапазону концентрацій і шляху введення. Таку інформацію потім можна використовувати для визначення прийнятних доз та шляхів введення людям.

Терапевтично ефективна доза відповідає кількості протеїну або антитіла до нього, його антагоністів або інгібіторів, що полегшує симптоми або стан. Терапевтичну ефективність і токсичність таких сполук можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних методів з використанням культур клітин або експериментальних тварин, наприклад з визначенням ED₅₀ (доза, яка має терапевтичну ефективність для 50% популяції) і LD₅₀ (доза, летальна для 50% популяції). Співвідношення доз, які мають терапевтичну і токсичну дії, позначають як терапевтичний індекс, який можна виражати у вигляді співвідношення ED₅₀/LD₅₀. Переважними є фармацевтичні композиції, які мають високий терапевтичний індекс. Дані, одержані за допомогою аналізів на культурах клітин і дослідів на тваринах, використовують для визначення діапазону доз, призначених для введення людям. Дози таких сполук переважно знаходяться в діапазоні концентрацій у кровотоці, які

відповідають величині ED₅₀, яка має низьку токсичність або є нетоксичною. Варіювання доз у вказаному діапазоні залежить від застосовуваної дози форми, чутливості пацієнта і шляху введення.

Точну дозу вибирає кожен лікуючий лікар залежно від пацієнта, який підлягає лікуванню. Доза і шлях введення регулюються так, щоб забезпечувати рівні фрагментів, достатні для прояву активності або підтримування необхідної дії. Додаткові фактори, які слід враховувати, включають серйозність хворобливого стану, наприклад, розмір та локалізацію пухлини; вік і вагу пацієнта; дієту, частота частоту введення, комбінацію(ї) лікарських засобів, реакційні чутливості і переносимість/реакцію на лікування. Фармацевтичні композиції для тривалого застосування можна вводити кожні 3-4 дні, щотижня або один раз на кожні двох тижнів залежно від часу напівжиття і швидкості кліренсу конкретної композиції.

Нормальні рівні доз можуть змінюватися від 0,1 до 100000мкг аж до загальної дози приблизно 1г залежно від шляху введення. Рекомендації, які стосуються конкретних доз і шляхів їх введення, відомі з літератури [див. патенти US 4657760; 5206344 або 5225212]. Фахівці в даній галузі можуть готувати різні композиції для полінуклеотидів і протеїнів або їх інгібіторів. Аналогічно до цього, введення полінуклеотидів або поліпептидів повинно бути специфічно відносно конкретних клітин, умов, місць розташування і т.д.

Нижче даний винахід проілюстрований за допомогою прикладів. Приклади представлені лише з метою ілюстрації винаходу з посиланням на конкретні варіанти здійснення. Ці приклади, які ілюструють конкретні об'єкти винаходу, не обмежують обсяг винаходу.

Усі приклади здійснювали за допомогою стандартних методів, добре відомих і загальноприйнятих для фахівців у даній галузі, у іншому випадку вони докладно описані. Стандартні методи молекулярної біології, застосовувані в наведених нижче прикладах, можна здійснювати відповідно до стандартних посібників з проведення лабораторних експериментів, таких як Sambrook і ін., [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2-е вид.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989].

Приклад 1: Ідентифікація людського полінуклеотиду rg1

Rg1 ідентифікували як ген, який експресується в передміхуровій залозі, з використанням бази даних Incyte's LifeSeq. Нуклеотидну послідовність ідентифікували шляхом анотаційного пошуку з використанням як інструменту для аналізу бази даних наданою фірмою Incyte програми "Protein Function". Нуклеотидна послідовність була виявлена в категорії молекул клітинної адгезії в анотаційній базі даних і описана як гомолог f-спондину. Електронний Нозерн-аналіз розподілу полінуклеотидних послідовностей rg1 у наборі бібліотек у базі даних підтвердив, що високий рівень експресії rg1 виявлений у бібліотеці передміхурової залози і більш низькі рівні в цілому ряді бібліотек інших

тканин, у тому числі як нормальних, так і пухлинних тканин.

Після збирання набору клонів rg1 у базі даних у безперервну полінуклеотидну послідовність і редагування безперервної послідовності була ідентифікована повнорозмірна кодувальна послідовність у передбаченому зібраному полінуклеотиді. Ця послідовність кодувала протеїн, гомологічний до f-спондину і Міндину-2.

Клони фірми Incyte 1640796, 1712252 і 1880265 одержували на основі експериментальних досліджень фірми Incyte, а клон 3360733 ідентифікували як клон, який містить велику частину 5'-нуклеотидної послідовності. Цей клон повністю секвенували і встановлено, що він містить повнорозмірну кодувальну послідовність передбаченого протеїну RG1. Ця послідовність представлена на Fig.1 (SEQIDNO: 1).

Приклад 2: Експресія мРНК rg1

Рівень експресії мРНК rg1 у різних зразках нормальних і пухлинних тканин і в лініях клітин визначали за допомогою напівкількісної ПЛР і Taqman-аналізу (фірма Perkin-Elmer). Зразки нормальної тканини, доброякісної і злоякісної пухлини передміхурової залози, класифіковані відповідно до модифікованої системи класифікації Глеасона (Gleason), одержували з відділення урології медичної школи Стенфордського Університету (Stanford University School of Medicine). Із зразків виділяли РНК за допомогою стандартних методів. РНК з інших пухлинних і нормальних тканин одержували зі зразків, які надходять у продаж, включаючи зразки фірм Clonetechn і Biochain. Лінії клітин пухлини передміхурової залози (PC-3, LNCaP і DU145) одержували з американської колекції типових культур і розмножували в культурі стандартними методами з використанням середовища, що містить сироватку. Одержані з цих ліній клітин ксено-трансплантати пухлин імплантували безтимусним мишам і виділяли з мишей приблизно через 4-6 тижнів після імплантації. За допомогою стандартних методів з цих пухлин виділяли РНК.

Засновану на Taqman-аналізі ПЛР здійснювали з використанням праймерів: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (SEQ ID NO: 3) і GCC GCC TCC GCA AAG (SEQ ID NO: 4) і Taqman-зонда: 6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (SEQ ID NO: 5).

Ці праймери і зонд конструювали з використанням програмного забезпечення Perkin Elmer's Primer Express і синтезували за допомогою фірми Synthetic Genetics. ПЛР здійснювали з використанням 30-40 циклів і результат кількісно оцінювали з використанням РНК передміхурової залози для одержання стандартної кривої, яку застосовували для порівняльного аналізу. Цей аналіз продемонстрував, що найбільш високий вміст мРНК rg1 виявлено в передміхуровій залозі, а в ряді інших тканин цей рівень значно нижче (див. Фіг.5).

Приклад 3: Клонування й експресія RG1 у клітинах лінії BHK

Кодувальну ділянку RG1 одержували з плазмиди 3360733 фірми Incyte. Кодувальну послідовність піддавали ПЛР-ампліфікації з використанням праймерів

SST115

(5'-

TCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCC GGC-3') (SEQ ID NO: 6) і SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTAGACGCAGTTATCAGGGAC G-3') (SEQ ID NO: 7) у стандартній ПЛР (100мкл), використовуючи однократний (1×) буфер для полімерази Pfu Turbo (фірма Stratagene, Ла Джолла, штат Каліфорнія)/200мкл дНТФ/0,2мкл олігонуклеотидні праймери/2,5од. полімерази Pfu Turbo (фірма Stratagene). Використовували наступні умови ПЛР-ампліфікації: 3хв. при 95°C (15с при 95°C, 30с при 60°C, 2хв. при 72°C)×35, 7хв. при 72°C. Утворений продукт ПЛР-ампліфікації очищали за допомогою колонки типу QIAquick PCR (фірма Qiagen, Валенсія, штат Каліфорнія) і розщеплювали за допомогою рестриктаз XbaI і Pm1I, одержуючи фрагмент довжиною 1010 пар основ, який очищали на 1% агарозному гелі, використовуючи набір BIO 101 GeneClean (фірма Vista, штат Каліфорнія). Очищений фрагмент вбудовували шляхом лігування (використовуючи набір Epicentre Fast Link (фірма Epicenter, Медісон, штат Вісконсін) з нецитопатогенним експресійним вектором фірми Sindbis pSINrep21 [Agarov і ін., PNAS, 95: 12989-12994, 1998], розщепленим за допомогою XbaI і Pm1I, і трансформували компетентні клітини лінії DH5 альфа (фірма Life Technologies, Гейтерсберг, штат Каліфорнія) і відбирали на агарових LB-планшетах, які містять ампіцилін (100мкг/мл). Одну таку стійку до ампіциліну колонію вирощували в LB-середовищі з ампіциліном і за допомогою аналізу послідовності встановлено, що вона містить вбудовану кодувальну послідовність RG1. Цю плазмиду позначали як pPEG6.

2мкг pPEG6 використовували для трансфекції $1-3 \times 10^5$ клітин нирки дитинчати хом'яка (BHK), використовуючи реагент Ліпофектамін Плус (фірма Life Technologies, Гейтерсберг, штат Каліфорнія) відповідно до інструкцій виробника. Після трансфекції клітини інкубували в середовищі DMEM, доповненою фетальною бичачою сироваткою, протягом 24-48год., у цей проміжок часу клітини розводили в співвідношенні 1:10 і здійснювали відбір відносно клітин, які містять плазмиди, який ініціювали шляхом додавання пуроміцину (кінцева концентрація 2,5мкг/мл) і середовища DMEM, доповненого сироваткою. Після досягнення клітинами конфлюентності (через 4-5 днів після додавання пуроміцину) клітини промивали 3ФР, розводили в співвідношенні 1:10 і додавали середовище DMEM, доповнене сироваткою і 5мкг/мл пуроміцину. Ще через 2-3 дні середовище замінювали безсироватковим середовищем DMEM, що містить 5мкг/мл пуроміцину, вирощували протягом 2-3 днів і присутність протеїну RG1 у середовищі виявляли методом Вестерн-блотингу з використанням антитіл до RG1. Виявлена концентрація протеїну RG1 1мкг/мл.

Приклад 4: Одержання антитіл

Одержували кролячу поліклональну антисироватку до 5 синтетичних поліпептидних послідовностей, виведених з послідовності протеїну RG1. Ці послідовності були вибрані через їх передбачувану локалізацію на поверхні протеїну з метою одержання антисироватки, яку легше розрізнити поверхневим епітопам. Залишки цистеїну для синтезу замінювали аміномасляною кислотою (Abu). Нижче для 5 пептидів наведені специфічні амінокислотні послідовності, їх положення в протеїні RG1 і позначення.

Позначення	Положення	Амінокислотна послідовність
C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (SEQ ID NO: 9)
3C	77-91	HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10)
4C	188-210	DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO: 11)
5C	263-274	NEIVDSASVPET (SEQ ID NO: 12)

Для застосування як імуногену пептиди ковалентно зв'язували з гемоціаніном лімфи равлика (KLH) через додатковий С-кінцевий цистеїн. Аналогічно до цього, готували кон'югат бичачого сироваткового альбуміну (BSA) для аналізу титрів антисироватки за допомогою ELISA.

Кожним пептидом імунізували двох тварин. Сенсибілізацію здійснювали з використанням повного ад'юванта Фрейнда (0,5мг/тварину), наступні внутрішньом'язові бустер-ін'єкції здійснювали з тритижневими інтервалами, використовуючи 0,25мг/тварину в неповному ад'юванті Фрейнда. Періодично брали зразки крові для аналізу і за допомогою ELISA визначали в них титр антитіл, специфічних відносно кон'югату BSA-пептид і порівнювали з даними для преїмунної сироватки. Встановлено, що антисироватка до пептидів 1C і 3C була активною. Антисироватка до пептиду 2C не розпізнавала поліпептид RG1. Антисироватки до пептидів 4C і 5C не аналізували.

Моноклональні антитіла до RG1 одержували шляхом імунізації трансгенних мишей пептидами RG1 і міченим за допомогою 6 залишків гістидину злитого протеїну RG1, який експресується в E. coli. Спленоцити цих тварин зливали з клітинами мієломи з метою одержання клітин гібридами. За допомогою ELISA здійснювали скринінг утворених гібридом щодо вироблення антитіл до пептидів і протеїну RG1.

Приклад 5: Аналіз антитіл методом Вестерн-блотингу

Антисироватку оцінювали відносно RG1-специфічності за допомогою Вестерн-блотингу. Специфічну антисироватку до RG1 (одержаного при імунізації послідовностями 1C і 3C, вище) оцінювали відносно короткочасної

експресії RG1 у COS-клітинах, секреції нативного RG1 із клітин лінії LNCaP і вироблення RG1 у трансфектованих клітинах нирки дитинчати хом'яка (BHK). RG1-специфічну антисироватку додатково вивчали з використанням лізатів, одержаних з:

пухлин LNCaP, клітин LNCaP, пухлин PC-3, клітин PC-3 і декількох клінічних зразків пухлин передміхурової залози людини. Клітини і тканини лізували в детергентному буфері. Після кип'ятіння протягом 5хв. 10мкл кожного лізату вносили в 12% ДСН-поліакриламідний гель з метою розділення протеїнів. Потім розділені протеїни переносили на нітроцелюлозні мембрани. Специфічність зв'язування антитіл до RG1 підтверджували шляхом зв'язування в присутності гомологічних і гетерологічних пептидів. RG1-специфічна антисироватка виявила протеїн у всіх зразках крім клітин PC-3 і пухлин PC-3.

Приклад 6: Очищення нативного протеїну RG1, який секретується з клітин LNCaP

За допомогою Вестерн-блотингу встановлено, що вирощені в культурі клітини LNCaP секретують нативний протеїн RG1. Для очищення нативного протеїну клітини вирощували протягом 48год у безсироваткових середовищах. Ці безсироваткові кондиціоновані середовища збирали, центрифугували для видалення будь-яких клітин і концентрували приблизно в 50 разів ультрафільтрацією. Концентровані середовища потім розбавляли в 10 разів 20мМ натрій-ацетатним буфером, рН6,5 і вносили в Q-сефарозну аніонообмінну колонку. Елюювання колонки здійснювали в градієнті хлориду натрію (0,5% на хв), збираючи фракції об'ємом 2,0мл. Протеїн RG1 елюювався приблизно при 75мМ NaCl, що доведено за допомогою Вестерн-блотингу і ДСН-ПААГ. Смуги, які відповідають нативному протеїну RG1, відповідали маркерам із дещо меншою молекулярною масою, ніж злитий

протеїн 6His-RG1, що експресується у бактеріях, ймовірно через те, що в ньому відсутній злитий протеїн.

Приклад 7: Імуногістохімічне фарбування з метою виявлення експресії RG1

Рівень експресії протеїну RG1 оцінювали за допомогою наборів фірми LifeSpan Biosciences Inc. у різних зразках людських тканин, включаючи нирку, печінку, підшлункову залозу, м'яз, головний мозок і передміхурову залозу. Додаткові зразки тканини передміхурової залози одержували з відділення урології медичної школи Стенфордського Університету і тестували на Verlex. Зі зрізів тканин видаляли парафін за допомогою стандартних методик. Використовували поліклональне антитіло до RG1-3C як первинне антитіло, систему виявлення, засновану на застосуванні набору ABC-AP (AK5002) і набору Vector red substrate (Sk5002). Для одержання негативного контролю фарбування здійснювали за відсутності первинного антитіла.

Усі вказані у вищевикладеному описі публікації і патенти включені в нього як посилання. Хоча даний винахід описаний з посиланням на конкретні варіанти здійснення, фахівцям у даній галузі повинно бути очевидно, що без відмови від суті та обсягу винаходу в нього можна вносити різні зміни та еквівалентні заміни. Крім того, можуть бути зроблені різноманітні модифікації для того, щоб адаптувати конкретну ситуацію, матеріал, композицію, процес, стадію або стадії процесу до суті та обсягу даного винаходу. Мається на увазі, що такі модифікації підпадають під обсяг наведеної нижче формули винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```
<110> Harkins, Richard
      Parkes, Deborah
      Parry, Gordon
      Schneider, Douglas
      Steinbrecher, Renate

<120> ДНК, яка кодує новий поліпептид RG1

<130> 51791AUSM1

<140>
<141>

<150> 60/172,370
<151> 1999-12-16

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1785
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (296)..(1291)
```

<400> 1
 agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agaggtgat ccgacccggg gaaggtcgct
 60
 gggcagggcg agttgggaaa gcggcagccc ccgccgcccc cgcagccctt tctcctcctt
 120
 tctcccacgt cctatctgcc tctcgctgga ggccaggccg tgcagcatcg aagacaggag
 180
 gaactggagc ctcatctggc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaaata ggagctccgg
 240
 gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctcccg tgcctctgcc gggtg atg
 298
 Met
 -
 gaa aac ccc agc ccg gcc gcc gcc ctg ggc aag gcc ctc tgc gct ctc
 346
 Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala Leu
 5 10 15
 ctc ctg gcc act ctc ggc gcc gcc ggc cag cct ctt ggg gga gag tcc
 394
 Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
 20 25 30
 atc tgt tcc gcc gga gcc ccg gcc aaa tac agc atc acc ttc acg ggc
 442
 Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
 35 40 45
 aag tgg agc cag acg gcc ttc ccc aag cag tac ccc ctg ttc cgc ccc
 490
 Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro
 50 55 60 65
 cct gcg cag tgg tct tcg ctg ctg ggg gcc gcg cat agc tcc gac tac
 538
 Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr
 70 75 80
 agc atg tgg agg aag aac cag tac gtc agt aac ggg ctg cgc gac ttt
 586
 Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe
 85 90 95
 gcg gag cgc ggc gag gcc tgg gcg ctg atg aag gag atc gag gcg gcg
 634
 Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala
 100 105 110
 ggg gag gcg ctg cag agc gtg cac gcg gtg ttt tcg gcg ccc gcc gtc
 682
 Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val
 115 120 125
 ccc agc ggc acc ggg cag acg tcg gcg gag ctg gag gtg cag cgc agg
 730
 Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg Arg
 130 135 140 145
 cac tcg ctg gtc tcg ttt gtg gtg cgc atc gtg ccc agc ccc gac tgg
 778

59

85527

60

His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp
 150 155 160
 ttc gtg ggc gtg gac agc ctg gac ctg tgc gac ggg gac cgt tgg cgg
 826
 Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp Arg
 165 170 175
 gaa cag gcg gcg ctg gac ctg tac ccc tac gac gcc ggg acg gac agc
 874
 Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp Ser
 180 185 190
 ggc ttc acc ttc tcc tcc ccc aac ttc gcc acc atc ccg cag gac acg
 922
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr
 195 200 205
 gta acc gag ata acg tcc tcc tct ccc agc cac ccg gcc aac tcc ttc
 970
 Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe
 210 215 220 225
 tac tac cca cgg ctg aag gcc ctg cct ccc atc gcc agg gtg aca ctg
 1018
 Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr Leu
 230 235 240
 gtg cgg ctg cga cag agc ccc agg gcc ttc atc cct ccc gcc cca gtc
 1066
 Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro Val
 245 250 255
 ctg ccc agc agg gac aat gag att gta gac agc gcc tca gtt cca gaa
 1114
 Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu
 260 265 270
 acg ccg ctg gac tgc gag gtc tcc ctg tgg tcg tcc tgg gga ctg tgc
 1162
 Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys
 275 280 285
 gga ggc cac tgt ggg agg ctc ggg acc aag agc agg act cgc tac gtc
 1210
 Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val
 290 295 300 305
 cgg gtc cag ccc gcc aac aac ggg agc ccc tgc ccc gag ctc gaa gaa
 1258
 Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu
 310 315 320
 gag gct gag tgc gtc cct gat aac tgc gtc taa gaccagagcc ccgcagcccc
 1311
 Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
 325 330
 tggggccccc cggagccatg ggggtgctggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg
 1371
 ccgagggcac aggggggttc gcgctgctcc tgaccgcggg gagggcgcgc cgaccatctc
 1431
 tgcactgaag ggccctctgg tggccggcac gggcattggg aaacagcctc ctcttttccc
 1491

aaccttgctt cttaggggcc cccgtgtccc gtctgtcttc agcctctccc tccctgcagga
1551

taaagtcata cccaaggctc cagctactct aaattatgtc tccctataag ttattgctgc
1611

tccagggagat tctccttcat cgtccagggg cctgggtccc accgtgcttgc cctagctccc
1671

gacctgggtgc tctaggctgt gctgagccca ctctcccgag ggcgcaccca agcggggggcc
1731

acttgagaag tgaataaatg gggcggtttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa
1795

<210> 2

<211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu
20 25 30

Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr
35 40 45

Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg
50 55 60

Pro Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp
65 70 75 80

Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp
85 90 95

Phe Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala
100 105 110

Ala Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala
115 120 125

Val Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg
130 135 140

Arg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp
145 150 155 160

Trp Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp
165 170 175

Arg Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp
180 185 190

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp
195 200 205

Thr Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser
210 215 220

Phe Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr
225 230 235 240

```

Leu Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro
      245                      250                      255
Val Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro
      260                      265                      270
Glu Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu
      275                      280                      285
Cys Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr
      290                      295                      300
Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu
      305                      310                      315                      320
Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
      325                      330

```

<210> 3
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> опис штучної послідовності: праймер

<400> 3
 cgcgcatagc tccgactac
 19

<210> 4
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> опис штучної послідовності: праймер

<400> 4
 gccgcgtccg caaag
 15

<210> 5
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> опис штучної послідовності: зонд

<400> 5
 aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg
 30

<210> 6
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> опис штучної послідовності: праймер

<400> 6
 tccctctaga gccaccatgg aaaaccccaq cccggc
 36


```

<210> 7
<211> 35
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> опис штучної послідовності: праймер
<400> 7
aaggcatcac gtgttagacg cagttatcag ggacg
35

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> опис штучної послідовності: пептид
<400> 8
Pro Leu Gly Gly Glu Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr
  1             5             10             15
Ser Ile Thr

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> опис штучної послідовності: пептид2
<400> 9
Thr Phe Thr Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro
  1             5             10             15
Leu Phe Arg

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> опис штучної послідовності: пептид
<400> 10
His Ser Ser Asp Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser
  1             5             10             15

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> штучна послідовність

<220>
<223> опис штучної послідовності: пептид
<400> 11
asp Ala Glu Thr Asp Ser Glu Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala
  1             5             10             15
Thr Ile Pro Gly Asp Thr Val
                20

```

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> опис штучної послідовності: пептид

 <400> 12
 Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr
 1 5 10

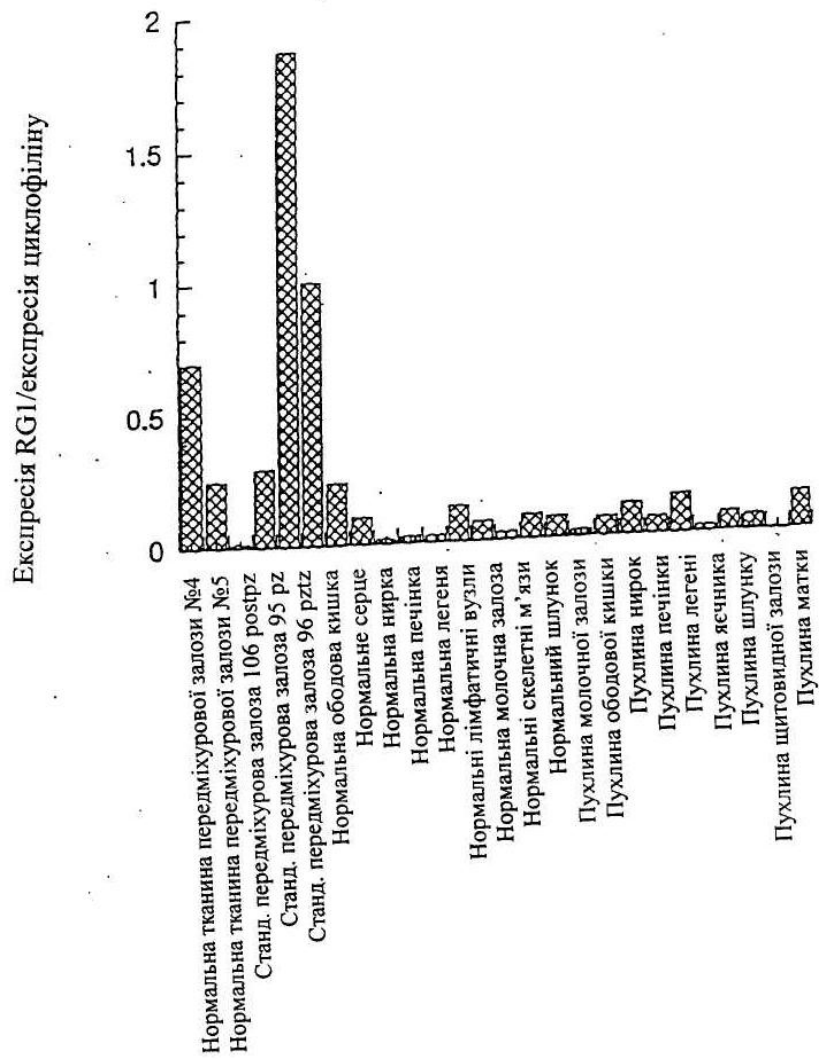
ФІГ. 1

1 AGAAAGGGGT GCGGCAGCAC TGCCAGGGGA AGAGGGTGAT CCGACCCGGG
 51 GAAGGTCGCT GGGCAGGGCG AGTTGGGAAA GCGGCAGCCC CCGCCGCCCC
 101 CGCAGCCCTT TCTCCTCCTT TCTCCACGT CCTATCTGCC TCTCGCTGGA
 151 GGCCAGGCCG TGCAGCATCG AAGACAGGAG GAACTGGAGC CTCATTGGCC
 201 GGCCCGGGGC GCCGCCCTCG GGCTTAAATA GGAGCTCCGG GCTCTGGCTG
 251 GGACCCGACC GCTGCCGGCC GCGCTCCCGC TGCTCCTGCC GGGTGATGGA
 301 AAACCCAGC CCGGCCGCGC CCCTGGGCAA GGCCCTCTGC GCTCTCCTCC
 351 TGGCCACTCT CGGCGCCGCC GGCCAGCCTC TTGGGGGAGA GTCCATCTGT
 401 TCCGCCGAG CCCCGGCCAA ATACAGCATC ACCTTCACGG GCAAGTGGAG
 451 CCAGACGGCC TTCCCAAGC AGTACCCCTT GTTCCGCCCC CCTGCGCAGT
 501 GGTCTTCGCT GCTGGGGGCC GCGCATAGCT CCGACTACAG CATGTGGAGG
 551 AAGAACCAGT ACGTCAGTAA CGGGCTGCGC GACTTTGCGG AGCGCGGCGA
 601 GGCTGGGCG CTGATGAAGG AGATCGAGGC GGCGGGGGAG GCGCTGCAGA
 651 GCGTGACGCG GGTGTTTTCG GCGCCCGCCG TCCCCAGCGG CACCGGGCAG
 701 ACGTCGGCGG AGCTGGAGGT GCAGCGCAGG CACTCGCTGG TCTCGTTTGT
 751 GGTGCGCATC GTGCCAGCC CCGACTGGTT CGTGGGCGTG GACAGCCTGG
 801 ACCTGTGCGA CCGGGACCGT TGGCGGGAAC AGGCGGCGCT GGACCTGTAC
 851 CCCTACGAGC CCGGGACGGA CAGCGGCTTC ACCTTCTCCT CCCCCAACTT
 901 CGCCACCATC CCGCAGGACA CCGTGACCGA GATAACGTCC TCCTCTCCCA
 951 GCCACCCGGC CAACTCCTTC TACTACCCAC GGCTGAAGGC CCTGCCTCCC
 1001 ATGCCCAGGG TGACACTGGT GCGGCTGCGA CAGAGCCCCA GGGCCTTCAT
 1051 CCCTCCCGCC CCAGTCCTGC CCAGCAGGGA CAATGAGATT GTAGACAGCG
 1101 CCTCAGTTCC AGAAACGCGG CTGGACTGCG AGGTCTCCCT GTGGTCTGTC
 1151 TGGGGACTGT GCGGAGGCCA CTGTGGGAGG CTCGGGACCA AGAGCAGGAC
 1201 TCGCTACGTC CGGGTCCAGC CCGCCAACAA CGGGAGCCCC TGCCCGGAGC
 1251 TCGAAGAAGA GGCTGAGTGC GTCCCTGATA ACTGCGTCTA AGACCAGAGC

[illegible]

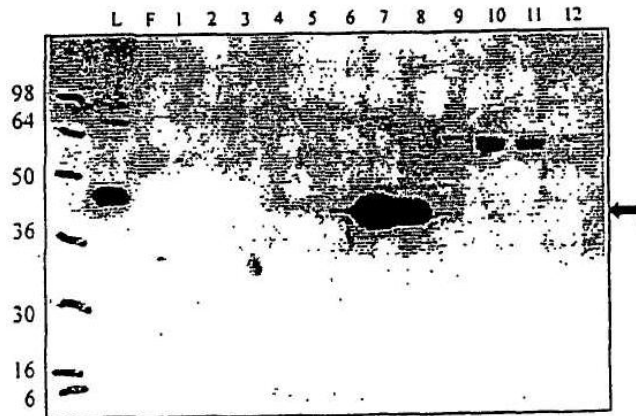
GGACCTGTACCCCTACGACGCCGGGACGGACAGCGGCTTCACCTTCTCCTCCCCAACTT
 841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
 CCTGGACATGGGGATGCTGCGGCCCTGCCTGTGCGCGAAGTGGAAAGAGGAGGGGGTTGAA
 b D L Y P Y D A G T D S G F T F S S P N F -
 CGCCACCATCCCGCAGGACACGGTGACCGAGATAACGTCCTCCTCTCCAGCCACCCGGC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GCGGTGGTAGGGCGTCTGTGCCACTGGCTCTATTGCAGGAGGAGAGGGTCGGTGGGCCG
 b A T I P Q D T V T E I T S S S P S H P A -
 CAACTCCTTCTACTACCCACGGCTGAAGGCCCTGCCTCCCATCGCCAGGGTGACACTGGT
 961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 GTTGAGGAAGATGATGGGTGCCGACTTCCGGGACGGAGGGTAGCGGTCCCACTGTGACCA
 b N S F Y Y P R L K A L P P I A R V T L V -
 GCGGCTGCGACAGAGCCCCAGGGCCTTCATCCCTCCCGCCCCAGTCCTGCCAGCAGGGA
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 CGCCGACGCTGTCTCGGGTCCCAGGAGTAGGGAGGGCGGGGTCAGGACGGGTGCTCCCT
 b R L R Q S P R A F I P P A P V L P S R D -
 CAATGAGATTGTAGACAGCGCCTCAGTTCCAGAAACGCCGCTGGACTGCGAGGTCTCCCT
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 GTTACTCTAACATCTGTGCGGAGTCAAGGTCTTTGCGGCGACCTGACGCTCCAGAGGGA
 b N E I V D S A S V P E T P L D C E V S L -
 GTGGTCGTCTGGGACTGTGCGGAGGCCACTGTGGGAGGCTCGGGACCAAGAGCAGGAC
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 CACCAGCAGGACCCCTGACACGCCTCCGGTGACACCCCTCCGAGCCCTGGTTCTCGTCTG
 b W S S W G L C G G H C G R L G T K S R T -
 TCGTACGTCCGGGTCCAGCCCGCAACAACGGGAGCCCTGCCCGAGCTCGAAGAAGA
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 AGCGATGCAGGCCCAAGGTGCGGCGGTGTGTCCTCGGGGACGGGGCTCGAGCTTCTTCT
 b R Y V R V Q P A N N G S P C P E L E E E -
 GGCTGAGTGCGTCCCTGATACTGCGTCTAAGACCAGAGCCCGCAGCCCTGGGGCCCC
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 CCGACTCAGCAGGACTATTGACGCAGATTCTGGTCTCGGGGCGTCCGGGACCCCGGGG
 b A E C V P D N C V *
 CCGGAGCCATGGGGTGTGCGGGGCTCCTGTGACGGCTCATGCTGCAGGCGGCCGAGGGCA
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 GGCTCGGTACCCACAGCCCCGAGGACAGTCCGAGTACGACGTCCGCCGGCTCCCGT
 CAGGGGGTTTCGCGCTGCTCCTGACCGCGGTGAGGCGCGCGGACCATCTCTGCACTGAA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 GTCCCCCAAAGCGGACGAGGACTGGGCCACTCCGGCGCGGCTGGTAGAGACGTGACTT
 GGGCCCTCTGGTGGCCGGCACGGGCAATTGGGAAACAGCCTCCTCCTTTCCAACTTGCT
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 CCGGGAGACCACCGCCGTGCCCGTAACCCTTTGTGCGGAGGAGAAAGGGTTGCAACGA
 TCTTAGGGGGCCCCGTGTCCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCCTGCAGGATAAAGTCAT
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 AGAATCCCCGGGGGCACAGGGCAGACGAGAGTCGGAGGAGGAGGACGTCTATTTCAGTA
 CCCCAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGTCTCCTTATAAGTTATTGCTGCTCCAGGAGA
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 GGGGTTCGAGGTGATGAGATTAAATACAGAGGAATATTCAATAACGACGAGGTCTCT
 TTGTCCTTCATCGTCCAGGGGCTGGCTCCACAGTGGTTGCAGATACCTCAGACCTGGTG
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 AACAGGAAGTAGCAGGTCCCCGACCGAGGGTGACCAACGTCTATGGAGTCTGGACCAC
 CTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACTCTCCCGAGGGCGCATCCAAGCGGGGGCCACTTGAGAA
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 GAGATCCGACAGCTCGGGTGAGAGGGCTCCCGCTAGGTTCCGCCCCGGTGAACCTCT
 GTGAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTC
 1741 -----+-----+-----+-----+ 1770
 CACTTATTTACCCCGCAAAGCCTTCGCAG

ФІГ. 5

Експресія мРНК *rg1* в тканинах людини

ФІГ. 6

Очищення нативного протеїну RG1, який секретується
клітинами лінії LNCap



ФІГ. 7

Імуногістохімічне фарбування з метою виявлення експресії RG1

