



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **84832** (13) **C2**

(51) МПК (2006)

C07K 14/705 (2006.01)

A23L 1/305

A23C 9/13

A23C 19/093 (2008.01)

A23C 9/152

A61K 38/17

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A61P 11/00

A61P 13/00

A61P 15/06 (2006.01)

A61P 17/00

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 29/00

A61P 37/00

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ОСТЕОПРОТЕГЕРИН, ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ХАРЧОВОГО ПРОДУКТУ ТА КОРМУ ДЛЯ ТВАРИН

1

2

(21) 2003109812

(22) 15.03.2002

(24) 10.12.2008

(86) PCT/EP02/02912, 15.03.2002

(31) 01 108 414.2

(32) 03.04.2001

(33) EP

(46) 10.12.2008, Бюл.№ 23, 2008 р.

(72) ВІДАЛ КАРІН, ВАН ДЕН БРУК ПЕТЕР,
ОФФОРД КЕВІН ЕЛІЗАБЕТ, ДОННЕ-ЮГ АНН

(73) СОСЬЄТЕ ДЕ ПРОДЮІ НЕСТЛЕ С.А.

(56) EP A1 0816380, 07.01.1998.

WO A9723614, 03.07.1999.

Kyoji Yamaguchi, Masahiko Kinoshita.,
Characterization of structural domains of human
osteoclastogenesis inhibitory factor. J Biol Chem.
1998 Feb 27; 273(9): P.5117-5123.

WO A1 0116299, 08.03.2001.

WO A 0024771, 04.05.2000.

EP A2 0786473, 30.07.1997.

KONG YY ET AL.: "Osteoprotegerin ligand: a
regulator of immune responses and bone physiology"

IMMUNOLOGY TODAY, vol. 21, no. 10, October
2000 (2000-10), pages 495-502.

SIMONET WS ET AL.: "Osteoprotegerin: A Novel
Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone
Density" CELL, vol. 89, 18 April 1997 (1997-04-18),
pages 309-319.

(57) 1. Остеопротегерин, який одержують з жіночого
чи коров'ячого молока або молозива і який має
профіль глікозилювання, що дає початок поліпеп-
тиду з молекулярною масою приблизно 80, 130 і
200 кДа, яку вимірюють способом, що описаний у
даному винаході.

2. Харчовий продукт, який містить остеопротеге-
рин за п.1.

3. Харчовий продукт за п.2, який вибирають із
групи, що складається з молока, йогурту, сиру,
кисломолочних продуктів, ферментованих продук-
тів на основі молока, морозива, ферментованих
продуктів на основі злаків, порошоків на основі мо-
лока, дитячих сумішей.

4. Корм для тварин, який містить остеопротегерин
за п. 1.

(13) **C2**

(11) **84832**

(19) **UA**

5. Фармацевтична композиція для профілактики або лікування розладів, пов'язаних з кістковим ремоделюванням, та/або імунних розладів, що містить ефективну кількість остеопротегерину за п.1 у поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм.
6. Фармацевтична композиція за п. 5, яку вибирають з групи, що складається з розчинів, сухої пероральної добавки, рідкої пероральної добавки, сухого харчування в тубах чи рідкого харчування в тубах.
7. Застосування остеопротегерину за п.1 для виготовлення харчового продукту за будь-яким з пп. 2 та 3.
8. Застосування остеопротегерину за п.1 для виготовлення корму для тварин за п. 4.
9. Застосування остеопротегерину за п.1 для виготовлення фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 5 та 6.
10. Застосування за п. 9, у якому розлад є остеопорозом, хворобою Педжета, остеомієлітом, інфекційними uszkodженнями кістки, що ведуть до втрати кісткової тканини, гіперкальціємією, остеопенією, остеонекрозом, втратою кісткової тканини внаслідок остеоартриту чи ревматоїдного артрити, періодонтальною втратою кістки та/або остеолітичним метастазом.
11. Застосування за п. 9, у якому розлад є алергією, автоімунним захворюванням, запальними хворобами кишечника, системними автоімунними станами, порушеннями регуляції проліферації й апоптозу клітин та імунопатологічними станами шкіри, ротової порожнини, шлунково-кишкового і сечостатевого тракту чи дихальних шляхів.
12. Застосування за будь-яким з пп. 9-11, у якому розлади зв'язані з передчасними родами та/або низькою масою тіла при народженні.

13. Застосування остеопротегерину за п.1 для одержання харчового продукту для профілактики розладів, зв'язаних з кістковим ремоделюванням.
14. Застосування за п. 13, у якому розлад є остеопорозом, хворобою Педжета, остеомієлітом, інфекційними uszkodженнями кістки, що ведуть до втрати кісткової тканини, гіперкальціємією, остеопенією, остеонекрозом, втратою кісткової тканини внаслідок остеоартриту чи ревматоїдного артрити, періодонтальною втратою кістки та/або остеолітичним метастазом.
15. Застосування за будь-яким з пп. 12, 13, у якому розлади зв'язані з передчасними родами та/або низькою масою тіла при народженні.
16. Застосування остеопротегерину за п.1 для одержання харчового продукту для профілактики імунних розладів.
17. Застосування за п. 16, у якому розлад є алергією, автоімунним захворюванням, запальними хворобами кишечника, системними автоімунними станами, порушеннями регуляції проліферації й апоптозу клітин та імунопатологічними станами шкіри, ротової порожнини, шлунково-кишкового і сечостатевого тракту чи дихальних шляхів.
18. Застосування за будь-яким з пп. 16 та 17, у якому розлади зв'язані з передчасними родами та/або низькою масою тіла при народженні.
19. Застосування остеопротегерину за п.1 для одержання харчового продукту для розвитку кісткової речовини та/або імунної системи.
20. Застосування остеопротегерину за п.1 для одержання фармацевтичної композиції для розвитку кісткової речовини та/або імунної системи.

Даний винахід відноситься до остеопротегерину, який можна одержати з молочних джерел, зокрема, з жіночого і коров'ячого молока. Даний винахід також відноситься до його застосування для одержання препарату, що приймається усередину, та/або фармацевтичної композиції, зокрема, до застосування такого препарату/композиції для попередження чи лікування розладів, зв'язаних з метаболізмом у кістках та імунною функцією.

У ссавців кістки забезпечують опору тілу і складаються з мінеральних речовин, матриксу з колагенових та неколагенових білків і клітинного компонента, їхній ріст і підтримання регулюються багатьма різними факторами, включаючи регуляцію і взаємодію клітинних типів, з яких вони складаються, тобто, хондроцитів, що утворюють хрящ, остеобластів, що синтезують і відкладають кістковий матрикс, і остеокластів, відповідальних за резорбцію кісткової речовини.

Хондроцити походять від мезенхімних клітин і генерують вихідну хрящову матрицю, необхідну для ендохондрального утворення кістки. Остеобласти, що промотують утворення кісткової тканини, походять від мезенхімних преостеобластів і локалізуються на поверхні кісток, де вони синте-

зують, транспортують і розміщують білки матриксу. З іншого боку, остеокласти, відповідальні за резорбцію кісток, походять від попередників гранулоцитів-моноцитів, присутніх у гематопоетичному кістковому мозку. Дії остеокластів та остеобластів тісно зв'язані, наприклад, під час процесу резорбції, опосередкованої остеокластами, вироблювані білкові фактори діють як сигнальні молекули для ініціації відновлення кісток остеобластами. Остеобласти, у свою чергу, можуть впливати на функцію остеокластів через експресію розчинних чи мембраннозв'язаних регуляторів. Тому нормальне ремоделювання кісток залежить від визначеного балансу між протилежними функціями утворення кісток та резорбції кісток, здійснюваними кожним з відповідних типів клітин.

Фактори росту, такі як фактор росту фібробластів (FGF) і трансформуючий фактор росту β (TGF- β), зберігаються в кістковому позаклітинному матриці і при секреції стимулюють локальне вивільнення кісткових клітин-попередників. Потім фактори, такі як кісткові морфогенні білки (BMP) і паратиреоїдний гормон (PTH), впливають на розвиток зазначених попередників у клітини, що формують кістки - остеобласти, кінцеві дифференціа-

ція та функція яких регулюються взаємодією клітини з білками кісткового матриксу.

Під час старіння індивідуум зазнає поступової втрати кісткової маси - явище, називане роз'єднанням, яке вважають результатом активності остеокластів, що перевершує таку остеобластів. У випадках, коли таке роз'єднання зберігається протягом тривалого часу, усе більше та більше кісткової речовини руйнується/розсмоктується, і результатом є стан, називаний остеопорозом.

Крім явища, що залежить від віку, втрата кісткової тканини також може бути викликана кальцієвим чи гормональним дефіцитом або станами, результатом яких є різні захворювання, такі як остеопороз, гіперкальціємія, хвороба Педжета, втрата кісткової тканини внаслідок остеоартриту, ревматоїдного артрити чи остеомієліту і т.п. Зменшена густина кісток, як правило, приводить до зниженої механічної міцності і підвищеної імовірності переломів.

Сучасні підходи до лікування остеопорозу та/або споріднених порушень у кістках включають застосування кальцію, який вводиться пацієнтам, що потребують цього. Останнім часом засоби, що залучаються до стимуляції та/або інгібування кісткових клітин, такі як гормони, кальцитонін, інсуліноподібний фактор росту чи остеопротегерин (OPG), також розглядаються як такі, що можуть застосовуватися при лікуванні вищевказаних хворобливих станів. Зазначені засоби, як правило, одержують рекомбінантними способами, і їх слід вводити до складу/готувати у формі галенових препаратів, для того, щоб відповідна речовина могла досягти мішені-кістки в активній формі.

У [WO 00/24771] описуються нуклеїнові кислоти, що кодуєть остеопротегериноподібні білки, та їхнє застосування, наприклад, при лікуванні остеопорозу. Поліпептид синтезують рекомбінантними способами і потім вводять до складу так, щоб він був сумісний з передбачуваним способом введення. Як такі способи пропонуються внутрішньовенне, інтрадермальне, підшкірне, пероральне (наприклад, шляхом інгаляції), трансдермальне (місцеве), через слизову оболонку і ректальне введення.

Взагалі, пошук придатної галенової форми для даної речовини є трудомістким і громіздким, тому що інгредієнти, використовувані з цією метою, повинні бути сумісними з активною речовиною, а також повинні забезпечувати достатній захист від різних умов в організмі. Однак, оскільки засоби, що стимулюють ріст кісток, синтезуються локально - у кістковій тканині - таку речовину важко вводити. Звичайно слід розробляти капсули, що допомагають речовині пройти через шлунково-кишковий тракт без руйнування під впливом несприятливих умов навколишнього середовища, що існують у ньому. Однак, такий спосіб введення також має деякі недоліки, тому що речовина повинна пройти печінку і транспортуватися рідинами організму, перш ніж вона досягне кістки. Крім того, це часто приводить до зниженої кількості активної біологічної речовини, що досягає тканини-мішені.

Отже, метою даного винаходу є створення засобу введення активної речовини індивідууму,

завдяки якому речовина діє в організмі індивідуума у специфічній тканині-мішені.

Відповідно, вищевказана проблема вирішується за допомогою остеопротегерину, який можна одержати з молока.

Фіг.1 зображує концентрацію остеопротегерину в жіночому грудному молоці під час різних стадій годування груддю.

Фіг.2 зображує результати аналізу методом вестерн-блотингу фракцій жіночого молока у відновних умовах з використанням 10% гелю з домішкою додецилсульфату натрію (SDS). Смуги OPG виявляють з використанням біотинільованих анти-OPG поліклональних антитіл BAF805 від R&D Systems і кон'югата стрептавідин-лужна фосфатаза (SAPP).

Фіг.3 зображує рестрикційну карту плазмиди, інтегрованої до геномної ДНК трансформантів Yarrowia.

Фіг.4 зображує результати аналізу методом ЗТ-ПЛР (RT-PCR) клітин жіночого грудного молока та епітеліальних клітин молочної залози людини MCF-7; доріжки 1 і 2: β -актин (смука очікуваного розміру 460п.о.); доріжки 3 і 4: OPG (смука очікуваного розміру 603п.о.). 1. Клітини жіночого грудного молока; 2. MCF-7, 3. Клітини жіночого грудного молока; 4. MCF-7.

Фіг.5 зображує результати експерименту, у якому OPG за даним винаходом інгібує апоптоз клітин Jurcat, індукований TRAIL.

Остеопротегерин (OPG), також відомий як фактор, що пригнічує остеокластогенез (OCIF), і подібна до TNF-рецептора молекула 1 (TR1), є описаним недавно членом сімейства рецепторів фактора некрозу пухлини (TNFR). Він пригнічує розвиток остеокластів як *in vitro*, так і *in vivo*, і підвищує густину кісток (остеопетроз). У здорових мишачих ембріонах OPG локалізується в хрящових рудиментах кісток, що розвиваються, а також у тонкому кишечнику.

Однак, на відміну від інших членів сімейства TNF-рецепторів, OPG не має трансмембранного домену. Більш того, можна показати, що OPG також є рецептором для цитотоксичного ліганду TRAIL (споріднений до TNF ліганд, що викликає апоптоз) і є ідентичним рецептору-1, що походить з фолікулярних дендритних клітин. Як такий, він, як передбачається, регулює загибель клітин, а також відіграє важливу роль в утворенні лімфоїдних тканин та регуляції імунних реакцій. Дійсно, показано, що у тварин, позбавлених OPG, виявляються недорозвинені лімфоїдні тканини.

У дослідженнях, що привели до даного винаходу, несподівано виявилось, що крім наявності остеопротегерину у, наприклад, кісткових тканинах, його також можна знайти в жіночому грудному молоці. В результаті, під час годування груддю мати, очевидно, забезпечує немовля вказаною біологічно активною речовиною у формі, здатній виживати в шлунково-кишковому тракті. З вказаного випливає, що OPG, продукований клітинами молочної залози, очевидно, відрізняється від OPG, виділеного з інших джерел, за його стабільністю та/або стійкістю до розкладу.

Без наміру бути зв'язаним якою-небудь теорією, у даний час вважають, що специфічний про-

філь глікозилування, що надається білку в клітинах молочної залози, робить поліпептид більш стійким по відношенню до кислої рідини шлунка та/або лужного навколишнього середовища, що знаходиться у кишечнику, так що після всмоктування в кишечнику і перенесення до кісткової тканини активний домен залишається інтактним та здатним виявляти свою біологічну активність.

OPG за даним винаходом, тобто у формі, яку можна одержати з молочних джерел, має поліпептидну послідовність, визначену SEQ ID NO.1, і виявляє розміри близько 80, 130 та 200кДа, відповідно, що відрізняється від розмірів OPG, одержуваного рекомбінантними способами (55кДа).

OPG за даним винаходом можна включати в препарат, що приймають усередину, який може бути харчовим продуктом, таким як, наприклад, молоко, йогурт, сир, кисломолочні продукти, ферментовані продукти на основі молока, морозиво, ферментовані продукти на основі злаків, порошки на основі молока, дитячі суміші, а також корм для тварин. У подібний спосіб, OPG за даним винаходом також можна включати в ентеральну чи фармацевтичну композицію, наприклад, обрану з групи, що складається з розчинів, сухої пероральної добавки, рідкої пероральної добавки, сухого харчування в тубах чи рідкого харчування в тубах.

Дійсно, оскільки OPG за даним винаходом є стійким, немає необхідності переводити активну сполуку в специфічну галенову форму для захисту її від різних та потенційно несприятливих умов, що існують у шлунково-кишковому тракті і рідинах організму.

Відповідно до іншого аспекту, даний винахід також відноситься до застосування остеопротегерину з молока для одержання препарату, що приймається усередину, такого як харчовий продукт, ентеральна композиція або фармацевтична композиція.

Остеопротегерин за даним винаходом і описаний вище препарат, що приймається усередину, можна використовувати для лікування та/або профілактики розладів кісткового ремоделювання.

Найбільш звичайним кістковим розладом є остеопенія - стан, що відноситься взагалі до будь-якого зменшення кісткової маси до рівнів нижче нормального. Такий стан може виникнути через зниження швидкості синтезу кісток, або збільшення швидкості деструкції кісток, або того й іншого. Найбільш звичайною формою остеопенії є первинний остеопороз, також називаний постменопаузальним та віковим остеопорозом. Така форма остеопорозу є наслідком загальної втрати маси кісткової тканини з віком і, як правило, результатом підвищення швидкості резорбції кісток при нормальній швидкості утворення кісток. Іншими формами остеопорозу є ендокринний остеопороз (гіпертиреоз, гіперпаратиреоз, синдром Кушинга та акромегалія), спадкові та природжені форми остеопорозу (недоосоналий остеогенез, гомоцистинурия, синдром Менкеса та синдром Райлі-Дея) і остеопороз внаслідок іммобілізації кінцівок.

Зовсім недавно було визнано, що остеопороз у популяції людей також зв'язаний з більш високою частотою артеріальної кальцифікації - компонента багатьох атеросклеротичних ушкоджень.

Отже, харчовий продукт, описаний вище, можна з повними підставами використовувати для попередження появи чи полегшення симптомів та/або структурних змін у кістках, зв'язаних з остеопенією чи остеопорозом, відповідно. Слід мати на увазі, що активна речовина буде включатися в харчовий продукт у кількості, достатній для того, щоб викликати бажану біологічну відповідь. Оскільки було знайдено, що OPG є сам складовою материнського молока, продукти на основі молока за своєю суттю є дуже придатними для доставки речовини в організм індивідуума.

З іншого боку, для лікування важких випадків остеопенії чи остеопорозу, відповідно, кращою лікувальною схемою може бути фармацевтична композиція, що містить остеопротегерин за даним винаходом у великих кількостях, тобто в кількостях, достатніх для припинення чи навіть реверсії хворобливого процесу. Такі композиції можуть містити OPG за даним винаходом як єдину активну речовину. Перевагою є те, що не передбачається жодного серйозного підбору складу для речовини. Тому у рамках даного винаходу розумно просто пресувати таблетку, що складається з "порошку OPG", при необхідності, з додаванням носіїв чи коригентів. Однак у випадку, коли OPG за даним винаходом слід вводити в композицію разом з іншими активними речовинами, слід враховувати природу і схильність до розкладу таких додаткових речовин у шлунково-кишковому тракті. OPG за даним винаходом, включений у дозовані лікарські форми, дасть можливість лікарю-куратору точніше контролювати добову чи тижневу дозу активної сполуки.

Остеопротегерин за даним винаходом також можна використовувати для попередження появи та/або лікування хвороби Педжета, остеомієліту, інфекційних ушкоджень кістки, що приводять до втрати кісткової тканини, гіперкальціємії, остеонекрозу, втрати кісткової тканини внаслідок остеартриту чи ревматоїдного артрити, періодонтальної втрати кістки та/або остеолітичного метастазу.

Також виявлено, що OPG є рецептором для ліганду, спорідненого з фактором некрозу пухлини (TRAIL), який індукуює апоптоз після зв'язування з його рецепторами, що містять домен смерті. Вважається, що він регулює загибель клітин, а також відіграє важливу роль в утворенні лімфоїдних тканин і регуляції імунних реакцій. Крім того, OPG є несправжнім рецептором для RANKL (ліганд для активатора рецептора NF-κB), який описують як продукт активованих Т-клітин. Зв'язування рецептора для RANKL на зрілих дендритних клітинах збільшує виживання дендритних клітин. Крім того, входження RANKL у контакт із його рецептором посилює ріст Т-клітин та функцію дендритних клітин.

Відповідно, даний винахід відноситься до застосування остеопротегерину, який можна одержати з жіночого та/або коров'ячого молока, для виробництва препарату, що приймається усередину, такого як, наприклад, харчова композиція чи ентеральна композиція, або для виробництва лікарського засобу, відповідно, з метою сприяння нормальному розвитку імунних тканин, з метою сприяння нормальній імунній функції і навіть для

попередження та/або лікування розладів імунної системи.

Розлади імунної системи, розглянуті в даному винаході, включають алергію, автоімунні реакції, сепсис, рак, запальні хвороби кишечника, системні автоімунні стани, серцево-судинні захворювання та імунопатологічні стани шкіри, ротової порожнини, шлунково-кишкового і сечостатевого тракту та дихальних шляхів.

Крім того, остеопротегерин за даним винаходом також можна використовувати для регуляції проліферації й апоптозу клітин, для стимуляції оральної стерпності, модуляції інфекційних процесів та бактеріальної колонізації новонародженого. Зокрема, у новонароджених зазначені вище розлади, загалом, можуть асоціюватися з передчасними родами та/або низькою масою тіла при народженні, так що у таких випадках остеопротегерин за даним винаходом можна просто вводити немовляті через продукти дитячого харчування.

Слід мати на увазі, що індивідуумом, якого лікують, може бути індивідуум будь-якого віку, хоча маленькі діти і старі є основними суб'єктами, яких приходить розглядати через властиву їм потребу в екзогенному остеопротегерині. Деяким індивідуумом, наприклад, новонародженим, остеопротегерин потрібний для розвитку кісткової речовини та/або імунної системи, так що в таких випадках може виявитися доречним введення сполуки та/або харчового продукту та/або фармацевтичної композиції за даним винаходом.

Однак, слід мати на увазі, що даний винахід також можна застосувати до дорослих людей для попередження появи якого-небудь з вищевказаних розладів. Також слід мати на увазі, що крім людей, індивідуумами, яких лікують, можуть бути тварини, наприклад, домашні тварини, для яких OPG за даним винаходом включають у корм.

OPG за даним винаходом можна одержати з молочного джерела, одержаного від ссавця, зокрема, з жіночого чи коров'ячого молока чи молозива OPG жіночого молока має амінокислотну послідовність з 380 аа і виявляє молекулярну масу близько 80, 130 і 200 кДа при порівнянні з білковими маркерами, використовуваними як еталони молекулярної маси (BioRad). Він виявляє 4 сайти для N-глікозилування і може бути присутнім у мономерній формі та димерній формі за рахунок утворення зв'язку S-S через Cys³⁷⁹.

OPG за даним винаходом можна виділити з молочних джерел, таких як жіноче чи коров'яче молоко. Однак, слід мати на увазі, що OPG за даним винаходом можна одержати рекомбінантними способами у відповідних клітинах, що дають профіль глікозилування, який спостерігають у "OPG з молока". Кращими клітинами для експресії є клітини молочної залози, тому що можна очікувати, що такі клітини дадуть ідентичний чи по суті ідентичний профіль глікозилування.

Придатні клітини для експресії OPG за даним винаходом можна одержати шляхом іморталізації придатним засобом, таким як вектор SV40 чи ген теломерази, і трансформації експресуючим вектором, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид OPG. Потрібний поліпептид

можна одержати, виділяючи його із супернатанта у випадку, коли поліпептид секретується, або збираючи клітини і виділяючи поліпептид із самих клітин. У випадку безперервного одержання кращим буде виділення із супернатанта.

Наведені далі приклади ілюструють винахід, не обмежуючи його.

Приклади

Зразки жіночого молока і людської сироватки

Зразки грудного жіночого молока (10-60 мл) беруть у здорових матерів в період до 17 днів після пологів у стерильних умовах шляхом зціджування за допомогою молоковідсмоктувача чи, іноді, ручним зціджуванням. Молоко зціджують у стерильні 50-мл центрифужні пробірки й обробляють протягом 2 годин після узяття. Після центрифугування (200×g, 10хв.) клітинний осад відразу ж відокремлюють і обробляють для екстрагування РНК. Решту молока заморожують при -20°C. Зразки людської сироватки одержують від здорових донорів і зберігають при -20°C.

Фракціонування жіночого грудного молока

Відокремлюють вершки від незбираного молока високошвидкісним центрифугуванням. Верхній шар вершків видобувають, промивають водою, і води від промивання вершків заморожують при -20°C та зберігають до використання. Розділення сироватки і казеїну досягають обробкою сичужним ферментом чи хімічним підкисленням (HCl) знятого молока, що викликає згортання казеїну. Потім центрифугуванням обробленого молока відокремлюють солодку сироватку від нерозчинного сичужного казеїну і кислую сироватку від кислотного казеїну, відповідно. Нарешті, з використанням ультрацентрифугування одержують розчинні молочні білки (ультрацентрифугувана сироватка) і нерозчинний міцелярний казеїн. Усі фракції казеїну і сироватки заморожують при -20°C та зберігають до використання.

Лінія клітин молочної залози людини

Клітинна лінія клітин молочної залози MCF-7 (American Type Culture Center (ATCC), Manassas, VA, HTB-22), одержана з плеврального випоту раку молочної залози, зберігає деякі характеристики диференційованого епітелію молочної залози. Клітини культивують у DMEM (Amimed Biosconcept, Allschwill, Швейцарія) з доданням 10% фетальної телячої сироватки (PCS, Amimed Biosconcept) і культивують при 37°C у вологій атмосфері, що містить 5% CO₂. Культуральне середовище заміняють 2-3 рази на тиждень. По досягненні конfluентності клітини відокремлюють з використанням трипсину/EDTA (GibcoBRL) при 37°C. Потім клітини готують для екстрагування РНК.

Аналіз методом вестерн-блотингу

Зразки молока розбавляють 1/25 відновним буфером Леммлі і кип'ятять протягом 5хв. Білки розділяють методом SDS-PAGE (10%) і переносять на нітроцелюлозні мембрани (BioRad). Блоти гібридизують з біотинільованими поліклональними антитілами проти людського OPG (BAF805 при 0,2 мкг/мл; R&D Systems) і комплексом стрептавідин-лужна фосфатаза (Pierce). Імунореактивність візуалізують за допомогою субстрату лужної фосфатази BCIP/NBT (Zymed Laboratories). Як етало-

ни молекулярної маси використовують попередньо пофарбовані білкові маркери (BioRad). Рекombінантний людський OPG (R&D Systems), що використовується як позитивний контроль, наносять у кількості 25нг на доріжку.

Експресія OPG клітинами жіночого грудного молока й епітеліальними клітинами молочної залози людини

Зворотну транскрипцію з наступною ПЛР використовують для ампліфікації транскриптів OPG у популяції клітин цільного жіночого грудного молока від однієї матері через 18 днів після пологів і в лінії епітеліальних клітин молочної залози MCF-7. Повну РНК екстрагують з клітин із використанням способу з Trizol (GibcoBRL). Коротко, Trizol (1мл на $5\text{--}10 \times 10^6$ клітин) додають до клітинного осаду, суміш кілька разів засмоктують у піпетку і видують та переносять до еппендорфівської пробірки. Додають хлороформ (0,2мл на 1мл Trizol), і пробірки інкубують протягом 5хв. перед центрифугуванням при 12000хд протягом 15 хв., 4 °С. РНК осаджують рівним об'ємом ізопропанолу і центрифугують при 12000хg протягом 10хв. Осад промивають 70% етанолом і потім ресуспендують у стерильній деіонізованій воді. РНК зберігають при -20°C до застосування.

Зразки РНК обробляють ДНКазою I, що не містить РНКаз, для видалення забруднення геномної ДНК. РНК визначають кількісно за поглинанням при 260нм і 280нм на спектрофотометрі при відповідному розведенні (100-200-кратному). Концентрацію РНК (у мкг/мл) обчислюють у такий спосіб: (поглинання A_{260}) \times (фактор розведення) \times 40мкг/мл. Зразок тотальної РНК, що по суті не містить білків, повинен мати відношення A_{260}/A_{280} 1,8-2,2.

РНК піддають зворотній транскрипції зворотною транскриптазою вірусу мишачого лейкозу Молоні (Perkin-Elmer). Зразки РНК (0,5мкг тотальної РНК), 0,5 одиниці інгібітору РНКаз, 1мМ кожного dNTP, 0,5нмоль/мл специфічного 3'-праймера, 5мМ MgCl_2 і 1,25 одиниці зворотної транскриптази інкубують у загальному об'ємі реакційної суміші 10мкл, що містить буфер для ферменту, який постачається виробником. Реакційну суміш інкубують протягом 30хв. при 42°C, а потім нагрівають протягом 5хв. при 95°C. Потім продукти зворотної транскрипції ампліфікують з Gold-ДНК-полімеразою (Perkin-Elmer) у термоциклері (Biolabo, Scientific Instruments, Chatel St. Denis, Швейцарія). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснюють у загальному об'ємі 50мкл із використанням 10мкл продуктів зворотної транскрипції в буфері для ПЛР, 2мМ MgCl_2 , 5мМ кожного dNTP, 0,2нмоль/мл обох OPG-специфічних праймерів - антисмислового АСТAGTTATAAGCAGCTTATTTTACTG та смислового GGAGGCATTCTTCAGGTTTGCTG і 1,25 одиниці ДНК-полімерази. Після початкової стадії денатурації протягом 10хв. при 95°C зразки ампліфікують у 35 циклах денатурації при 94°C протягом 45с, відпалу при 60°C протягом 1хв. і нарощування при 72°C протягом 1хв. 30с, з наступною 7-хв. стадією нарощування при 72°C. Усі зразки піддають ЗТ-ПЛР, використовуючи β -актин як позитивний контроль. Зразки продуктів ЗТ-ПЛР вносять в

1,2% агарозні гелі (що містять бромід етидію) у буфері 1 \times TAE і розділяють електрофорезом при 150В протягом 1 години. Продукти ЗТ-ПЛР візуалізують в УФ-світлі. Точний розмір смуг визначають шляхом порівняння з маркерами розмірів ДНК (Boehringer Mannheim).

ELISA-аналіз людського OPG (імуноферментний сендвіч-аналіз)

Концентрацію OPG, присутнього у грудному молоці і різних фракціях молока, вимірюють методом ELISA. З цією метою моноклональні антитіла проти OPG (MAB805, 1мкг/мл; R&D Systems, UK) наносять на 96-лункові планшети (Nunc) шляхом інкубації протягом ночі при 4°C. Потім планшети двічі промивають 0,05% розчином твіну-20 у PBS. Неспецифічне зв'язування блокують інкубацією планшетів з 2% розчином бичачого сироваткового альбуміну (BSA) у PBS ще протягом 2 годин при кімнатній температурі. Зразки чи рекombінантний OPG у стандартних концентраціях (0,119-121,5нг/мл; R&D Systems) інкубують у PBS-BSA протягом 3 годин при кімнатній температурі. Потім планшети чотири рази промивають PBS-твіном перед додаванням мічених біотином поліклональних антитіл проти OPG (BAF805, 0,5мкг/мл; R&D Systems) ще протягом однієї години. при кімнатній температурі. Після додаткових чотирьох промивань додають стрептавідин-пероксидазу (SAAP, 0,5мкг/мл, Kirkegaard & Perry KPL) і витримують протягом 1 години при кімнатній температурі. Потім планшети промивають чотири рази, і додають субстрат пероксидази ТМВ (KPL). Планшети накривають та інкубують у темряві протягом п'яти хвилин. Ферментативну реакцію зупиняють, додаючи 1Н HCl. Визначають поглинання при 450нм за допомогою зчитувального пристрою для ELISA (Dyplex Technologies). Межа чутливості становить приблизно 30пг/мл.

Біологічна активність OPG з жіночого молока

OPG є рецептором для ліганду, спорідненого фактору некрозу пухлини (TRAIL), що індукує апоптоз після зв'язування з рецепторами DR4 і DR5, що містять домен смерті. Розробляють біологічний аналіз, у якому OPG грудного жіночого молока можна перевірити на його здатність блокувати викликуваний TRAIL апоптоз таких клітин.

З цією метою клітини Jurkat, клон Е6-1 (ATCC), культивують у середовищі RPMI 1640 у модифікації постачальника ATCC, що містить 10% FCS (37°C та 5% CO_2). Клітини висівають при щільності 5×10^6 клітин/лунку на 96-лункові планшети (Nunc). У кожен лунку додають різні концентрації розчинного рекombінантного людського TRAIL (0-20нг/мл) у присутності 2мкг/мл білка-підсилювача - антитіл, що взаємодіють з розчинним рекombінантним людським TRAIL і за рахунок цього підвищують його активність (Alexis, Lauffelfingen, CH). Деякі лунки також містять 50нг/мл рекombінантного людського OPG (R&D Systems), зразки жіночого грудного молока (НМ; кінцеве розведення 1/80; зібрані в 1-ий чи 9-ий день після пологів) та/або 20мкг/мл моноклональних антитіл проти OPG (MAB805, R&D Systems). Планшети інкубують при 37°C протягом 16 годин. Життєздатність клітин визначають, додаючи ^3H -тимідин (1мкКі/лунку) під час останніх 6 годин культивування.

У контрольному середовищі інгібування проліферації клітин, викликане TRAIL, є очевидним при концентраціях понад 5нг/мл. Однак, зразки НМ запобігають такому інгібуванню. Цей ефект має місце явно через присутність OPG, тому що моноклональні антитіла проти OPG обертають зазначений ефект.

Результати показані на Фігурі 5.

Аналіз методом вестерн-блотингу

OPG синтезують у клітинах у виді мономера в 55кДа, але при позаклітинній секреції він перетворюється на зв'язаний дисульфідним зв'язком димер приблизно в 100кДа. У молоці смуги детектуються в області приблизно 80, 130 і 200кДа.

Концентрації OPG у жіночому грудному молоці

Вміст OPG у зразках грудного молока, взятих у 10 матерів-годувальниць в різний час у перші 17 днів лактації, перевіряють методом ELISA. Концентрації досягають максимальних значень у перші 1-3 дня лактації і потім знижуються. Концентрації у молоці коливаються від 50нг/мл до майже 2мкг/мл (Фіг.1).

Клітинне джерело OPG молока

Аналіз методом 3Т-ПЛР показує, що OPG за даним винаходом можна знайти в клітинах жіночого грудного молока та епітеліальних клітинах молочної залози. Конститутивна експресія мРНК для OPG виражена в обох типах необроблених клітин (Фіг.4).

Клонування OPG жіночого молока у дріжджах

Виділяють клітини з жіночого грудного молока (18 днів після пологів) центрифугуванням (200×g, 10хв.). З клітинного осаду екстрагують тотальну РНК із використанням Trizol® (Life Technologies, Basel, Швейцарія), обробляють ДНКазою I і потім очищають на центрифужних колонках RNeasy (Qiagen, Basel) згідно з рекомендаціями виробників. Продукт ПЛР, що кодує зрілу форму OPG, ампліфікують з такої тотальної РНК із використанням

системи 3Т-ПЛР Titan™ One tube відповідна до протоколу, наданому виробником (Roche Diagnostics, Rotkreuz).

З OPG-специфічним антисмисловим праймером

CCGGCCTCTTCGGCCGCCAAGCGAGAAACGTTT CCTCCAAAGTACC та смисловим праймером ACTAGITATAAGCAGCTTATTTTACTG з даної кДНК ампліфікують фрагмент ПЛР у 1174п.о. Продукт ПЛР розщеплюють SfiI-SpeI, очищають у гелі, і одержаний фрагмент у 1156п.о. лігують з розщепленою SfiI-XbaI і SAP-обробленою pINA1267, одержуючи pNFF270. Потім дану плазмиду вводять у дріжджі *Yarrowia lipolytica* шляхом трансформації. Фігура 3 зображує рестрикційну карту плазмиди, яку інтегрують до геномної ДНК трансформантів *Yarrowia* і SEQ ID NO. 1-білок, що кодується такою плазмидою OPG.

Послідовність клону pGEM-T OPG показана на Фігурі 6. Зрілий OPG представлений чорним шрифтом і наведений у трансьованому виді В опублікованій послідовності OPG/OCIF амінокислотний залишок 242 зрілого OPG представлений залишком Ala (A), у той час як всі аналізовані клони pGEM-T OPG у зазначеній позиції кодують залишок Asp (D). SfiI-SpeI фрагмент OPG даного клону переносять у pINA1267, розщеплену SfiI-XbaI. Одержана плазмиди має рестрикційну карту, зображену на Фігурі 3. Одиничну копію такої плазмиди інтегрують до геномної ДНК трансформантів *Yarrowia*. Білок, кодований такою плазмидою, показаний на Фігурі 4. Зрілий OPG показаний жирним шрифтом. Плазмиду pNFF270 вводять у *Yarrowia lipolytica* шляхом трансформації. Одержані трансформанти секретують білок, що перехресно реагує з OPG-специфічними антитілами, до культурального середовища, у той час як трансформанти *Y.lipolytica*, які несуть експресійний вектор, що не містить вставки, не секретують такий білок.

Перелік послідовностей

<110> Société des Produits Nestlé, S. A.

<120> Остеопротегерин у молоці та його застосування у регуляції метаболізму у кістках

<130> 80280

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens sapiens

<400> 1

Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
20 25 30

Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro
50 55 60

Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe
85 90 95

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
100 105 110

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe
115 120 125

Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
130 135 140

17	84832	18
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His		
145	150	155 160
Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile		
	165	170 175
Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr		
	180	185 190
Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly		
	195	200 205
Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser		
	210	215 220
Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn		
225	230	235 240
Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys		
	245	250 255
Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu		
	260	265 270
Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala		
	275	280 285
Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile		
	290	295 300
Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr		
305	310	315 320
Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe		
	325	330 335
Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His		
	340	345 350
Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile		
	355	360 365
Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
	370	375 380

<210> 2

<211> 1182

<212> ДНК

<213> Homo sapiens sapiens

<400> 2

```

tccggcctct tcggccgcca agcgagaaac gtttctcca aagtaccttc attatgacga 60
agaaacctct catcagctgt tgtgtgacaa atgtctctct ggtacctacc taaaacaaca 120
ctgtacagca aagtggaaga ccgtgtgcgc cccttgccct gaccactact acacagacag 180
ctggcacacc agtgacgagt gtctatactg cagccccgtg tgcaaggagc tgcagtagct 240
caagcaggag tgcaatcgca cccacaaccg cgtgtgcgaa tgcaaggaag ggcgtacct 300
tgagatagag ttctgcttga aacataggag ctgccctctt ggatttggag tggtgcaagc 360
tggaacccca gagcgaaata cagtttgcaa aagatgtcca gatgggttct tctcaaatga 420
gacgtcatct aaagcaccct gtagaaaaca cacaatttgc agtgtctttg gtctcctgct 480
aactcagaaa ggaaatgcaa cacacgacaa catatgttcc ggaaacagtg aatcaactca 540
aaaatgtgga atagatgtta cctgtgtgta ggaggcatte ttcagggttg ctgttcctac 600
aaagtttacg cctaactggc ttagtgtctt ggtagacaat ttgcctggca ccaaagtaaa 660
cgcagagagt gtagagagga taaaacggca acacagctca caagaacaga ctttcagct 720
gctgaagtta tggaacatc aaaacaaaga ccaagatata gtcaagaaga tcatccaaga 780
tattgacctc tgtgaaaaca gcgtgcagcg gcacattgga catgctaacc tcaccttcga 840
gcagcttctg agcttgatgg aaagcttacc gggaaagaaa gtgggagcag aagacattga 900
aaaaacaata aaggcatgca aaccagtgta ccagatcctg aagctgctca gtttgtggcg 960
aataaaaaat ggcgaccaag acaccttgaa gggcctaata cagcactaa agcactcaa 1020
gacgtaccac ttccccaaaa ctgtcactca gagtctaaag aagaccatca ggttccttca 1080
cagcttcaca atgtacaaat tgtatcagaa gttattttta gaaatgatag gtaaccaggt 1140
ccaatcagta aaaataagct gcttataact agtatcacta gt 1182

```

<210> 3

<211> 537

<212> PRT

<213> Homo sapiens sapiens

<400> 3

```

Met Lys Leu Ala Thr Ala Phe Thr Ile Leu Thr Ala Val Leu Ala Ala
  1             5             10             15

Pro Leu Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ala Val
          20             25             30

Pro Glu Gly Pro Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser Val Val
          35             40             45

Ala Lys Gln Ser Lys Lys Phe Lys His His Lys Arg Asp Leu Asp Glu
          50             55             60

Lys Asp Gln Phe Ile Val Val Phe Asp Ser Ser Ala Thr Val Asp Gln
          65             70             75             80

```

21	84832	22
Ile Ala Ser Glu Ile Gln Lys Leu Asp Ser Leu Val Asp Glu Asp Ser		
85	90	95
Ser Asn Gly Ile Thr Ser Ala Leu Asp Leu Pro Val Tyr Thr Asp Gly		
100	105	110
Ser Gly Phe Leu Gly Phe Val Gly Lys Phe Asn Ser Thr Ile Val Asp		
115	120	125
Lys Leu Lys Glu Ser Ser Val Leu Thr Val Glu Pro Asp Thr Ile Val		
130	135	140
Ser Leu Pro Glu Ile Pro Ala Ser Ser Ala Ala Lys Arg Glu Thr Phe		
145	150	155
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu		
165	170	175
Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala		
180	185	190
Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp		
195	200	205
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys		
210	215	220
Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val		
225	230	235
Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
245	250	255
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro		
260	265	270
Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn		
275	280	285
Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val		
290	295	300
Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile		
305	310	315
Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr		
325	330	335

23	84832	24
Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr		
340	345	350
Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val		
355	360	365
Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu		
370	375	380
Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln		
385	390	395
Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser		
405	410	415
Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg		
420	425	430
Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile		
435	440	445
Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu		
450	455	460
Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly		
465	470	475
Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
485	490	495
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr		
500	505	510
Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln		
515	520	525
Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
530	535	

<210> 4

<211> 28

<212> ДНК

<213> Homo sapiens sapiens

<400> 4

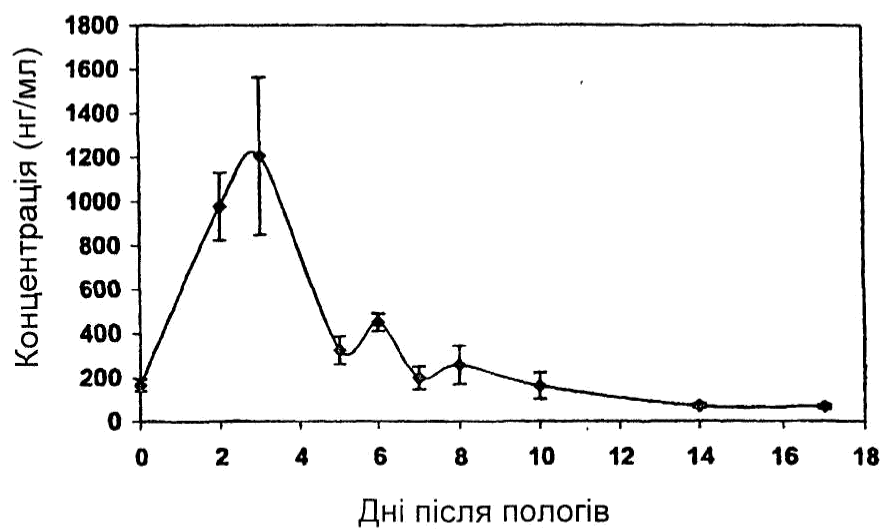
actagttata agcagcttat ttttactg

23

46

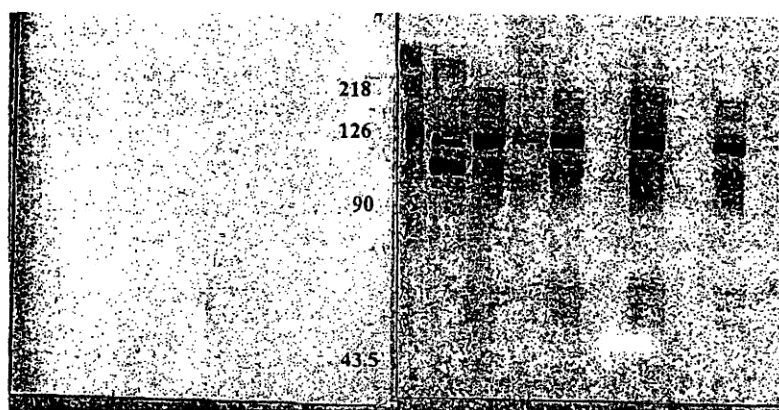
28

Концентрація ORG у жіночому грудному молоці



ФІГ. 1. Концентрація ORG у жіночому грудному молоці у різний час в період лактації

Мол. вага



33.9

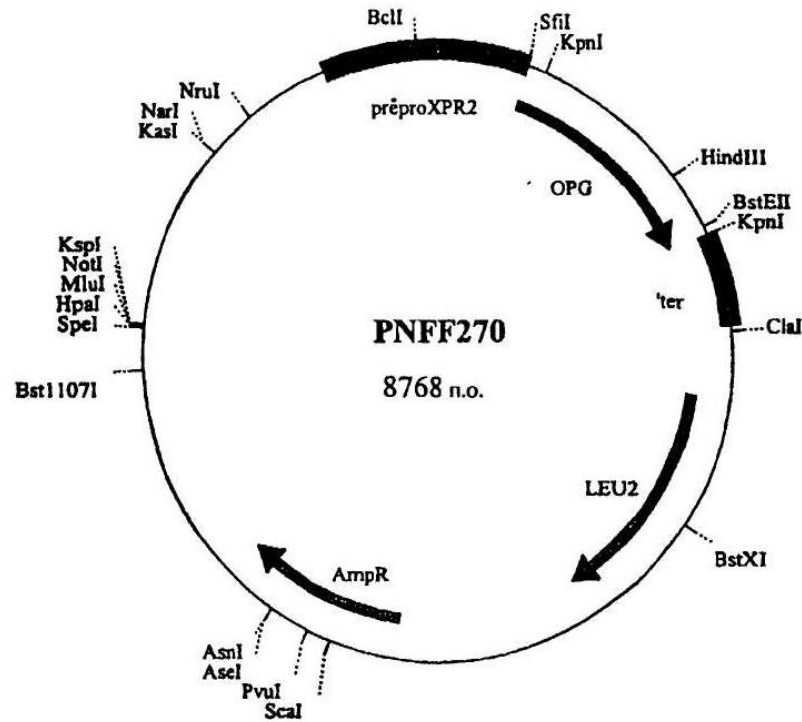
PBS + SAPP

Рекомбінантний ORG
Зняте молоко
Вершки (промивка)
Сироватка (ультрацентрифугування)
Казеїн (ультрацентрифугування)
Солодка сироватка
Сичужний казеїн
Кисла сироватка
Кислотний казеїн

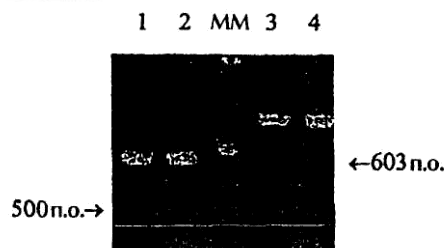
BAF 805 + SAPP

Рекомбінантний ORG
Зняте молоко
Вершки (промивка)
Сироватка (ультрацентрифугування)
Казеїн (ультрацентрифугування)
Солодка сироватка
Сичужний казеїн
Кисла сироватка
Кислотний казеїн

ФІГ. 2. Аналіз методом вестерн-блотингу фракцій жіночого молока у відновних умовах з використанням 10% геля з ДСН. Смуги ORG виявляють з використанням біотинільованих поліклональних антитіл BAF805 проти ORG від R&D Systems та комплексу стрептавідин-лужна фосфатаза (SAPP).



ФІГ. 3. Рестрикційна карта плазміди, яку інтегрують до геномної ДНК трансформантів *Yarrowia*.

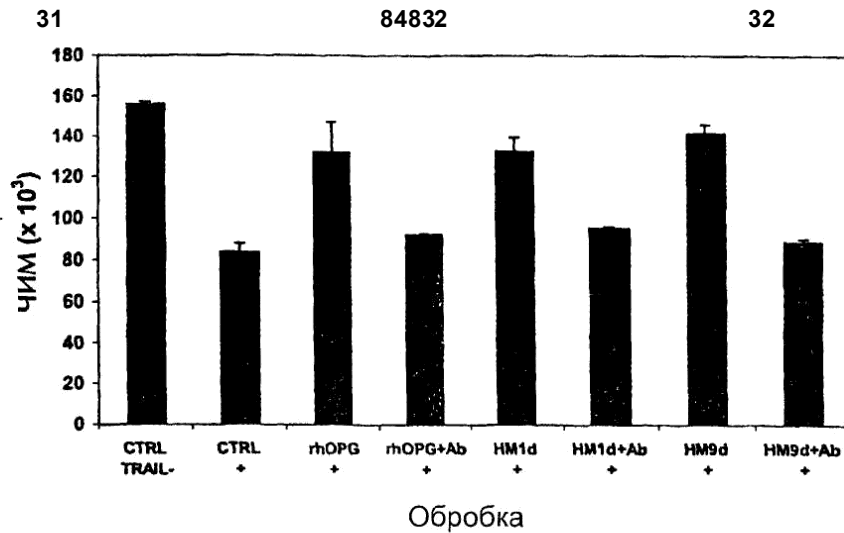


ФІГ. 4. Аналіз методом ЗТ-ПЛР клітин жіночого грудного молока та епітеліальних клітин молочної залози людини MCF-7.

Доріжки 1 та 2: β -лактин (смуга очікуваного розміру 460 п.о.)

Доріжки 3 та 4: ORG (смуга очікуваного розміру 603 п.о.)

1. Клітини жіночого грудного молока
2. MCF-7
3. Клітини жіночого грудного молока
4. MCF-7



ФІГ. 5. ORG інгібує апоптоз клітин Jurkat, індукований TRAIL. Фігура відображує окремий характерний експеримент з клітинами Jurkat, обробленими 20 нг/мл TRAIL та рекомбінантним ORG людини (rhORG) або жіночим молоком (HM) у кінцевому розведенні 1/80. HM у вищевказаному експерименті взято у однієї матері на 1 день чи на 9 день після пологів. Антитіла (Ab) проти ORG використовують у концентрації 20 мкг/мл. Проліферацію клітин вимірюють за включенням ³H-тимідину. В контрольних лунках (CTRL) на клітини діють культуральним середовищем з TRAIL чи без нього.

MKLATAFTILTAVLAAPLAAPAPAPDAAPAAVPEGPAAYSSILSVVAKQSKKFKHHR
DLDEKDQFIVVFDSSATVDQIASEIQKLDLSDVDESSNGITSALDLPVYTDGSGFLGFVG
KFNSTIVDKLKESVLTVEPDTIVSLPEIPASSAAKRETFPPKYLHYDEETSHQLLCDKC
PPGTYLKQHCTAKWKTVCAPCPDHYTDSWHTSDECLYCSFVCKELQYVKQECNRTHNRV
CECKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGFGVVQAGTPERNTVEKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHT
NCSVFGLLLTQKGNATHDNICSGNSESTQKCGIDVTLCEEAFFRFAVPTKFTPNWLSVLV
DNLPGTKVNAESVERIKRQHSSQEQTFFQLKLWKHQNKAQDIVKKIIQDIDLCENSVQRH
IGHANLTTFEQLRSLMESLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKG
LMHALKHSKTYHFPKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL

ФІГ. 6. Білок, кодований плазмідом ORG, вбудованою у Y. Lipolytica. Зрілий ORG показаний жирним шрифтом.

ОСТЕОПРОТЕГЕРИН У МОЛОЦІ

1	<u>TCCGGCCTCTTCGGCCGCCaagcga</u>	GAAACGTTTCCTCCAAAGTACCTTCATTATGACGA	60
1	<i>xpr2</i>	E T F P P K Y L H Y D E	12
61	AGAAACCTCTCATCAGCTGTTGTGTGACAAATGTCCTCCTGGTACCTACCTAAAAACAACA		120
13	E T S H Q L L C D K C P P G T Y L K Q H		32
121	CTGTACAGCAAAGTGAAGACCGTGTGCGCCCTTGCCCTGACCACTACTACACAGACAG		180
33	C T A K W K T V C A P C P D H Y Y T D S		52
181	CTGGCACACCAAGTGACGAGTGTCTATACTGCAGCCCGTGTGCAAGGAGCTGCAGTACGT		240
53	W H T S D E C L Y C S P V C K E L Q Y V		72
241	CAAGCAGGAGTGCAATCGCACCCACAACCGCGTGTGCGAATGCAAGGAAGGGCGCTACCT		300
73	K Q E C N R T H N R V C E C K E G R Y L		92
301	TGAGATAGAGTTCTGCTTGAAACATAGGAGCTGCCCTCCTGGATTGGAGTGGTGCAAGC		360
93	E I E F C L K H R S C P P G F G V V Q A		112
361	TGGAACCCAGAGCGAAATACAGTTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTTCTTCTCAAATGA		420
113	G T P E R N T V C K R C P D G F F S N E		132
421	GACGTCATCTAAAGCACCTGTAGAAAACACACAAATTGCAGTGTCTTTGGTCTCCTGCT		480
133	T S S K A P C R K H T N C S V F G L L L		152
481	AACTCAGAAAGGAAATGCAACACACGACACATATGTTCCGGAAACAGTGAATCAACTCA		540
153	T Q K G N A T H D N I C S G N S E S T Q		172
541	AAAATGTGGAATAGATGTTACCTGTGTGAGGAGGCATTCTTCAGGTTTGCTGTTCTCTAC		600
173	K C G I D V T L C E E A F F R F A V P T		192
601	AAAGTTTACGCCTAACTGGCTTAGTGTCTTGGTAGACAATTTGCCTGGCACCAAAGTAAA		660
193	K F T P N W L S V L V D N L P G T K V N		212
661	CGCAGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGCAACACAGCTCACAGAAGACAGACTTTCAGCT		720
213	A E S V E R I K R Q H S S Q E Q T F Q L		232
	C		
721	GCTGAAGTTATGGAAACATCAAAACAAAGACCAAGATATAGTCAAGAAGATCATCCAAGA		780
233	L K L W K H Q N K D Q D I V K K I I Q D		252
	A		
781	TATTGACCTCTGTGAAAACAGCGTGCAGCGGCACATTGGACATGCTAACCTCACCTTCGA		840
253	I D L C E N S V Q R H I G H A N L T F E		272
841	GCAGCTTCGTAGCTTGATGGAAAGCTTACCGGGAAAGAAAGTGGGAGCAGAAGACATTGA		900
273	Q L R S L M E S L P G K K V G A E D I E		292
901	AAAAACAATAAAGGCATGCAAAACCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTTGTGGCG		960
293	K T I K A C K P S D Q I L K L L S L W R		312
961	AATAAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCACTAAAGCACTCAAA		1020
313	I K N G D Q D T L K G L M H A L K H S K		332

```

1021 GACGTACCACTTTCCCAAACTGTCACTCAGAGTCTAAAGAAGACCATCAGGTTCTTCA 1080
333 T Y H F P K T V T Q S L K K T I R F L H 352
1081 CAGCTTCACAATGTACAAATTGTATCAGAAGTTATTTTATAGAAATGATAGGTAACCAGGT 1140
353 S F T M Y K L Y Q K L F L E M I G N Q V 372
1141 CCAATCAGTAAAAATAAGCTGCTTATAACTAGTATCACTAGT 1182
373 Q S V K I S C L 380

```

ФІГ 7. Послідовність ORG молока