



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002119208/15, 15.12.2000

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.12.2000

(30) Конвенционный приоритет:
07.12.2000 US 09/732,357

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2004

(45) Опубликовано: 10.09.2006 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 98/45442 A, 15.10.1998. WO 98/50073
A, 12.11.1998. WO 99/46281 A, 16.09.1999.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
16.07.2002

(86) Заявка РСТ:
US 00/33901 (15.12.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 01/44291 (21.06.2001)

Адрес для переписки:
101000, Москва, Малый Златоустинский пер.,
10, кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
Н.В.Кузенковой

(72) Автор(ы):

ХАРКИНЗ Ричард (US),
ПАРКЕЗ Дебора (US),
ПАРРИ Гордон (US),
ШНЕЙДЕР Дуглас У. (US),
ШТАЙНБРЕХЕР Ренате (US)

(73) Патентообладатель(и):

ШЕРИНГ АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ (DE)

(54) ДНК, КОДИРУЮЩАЯ НОВЫЙ ПЕПТИД RG1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и биотехнологии и касается антител, специфически связывающихся с новыми человеческими полипептидами внеклеточного матрикса, обозначенными как RG1, иммуноконъюгата, включающего эти антитела, а также способа

избирательного разрушения клетки, способа лечения рака предстательной железы и способа диагностики рака предстательной железы и метастазов у пациентов с раком предстательной железы. Преимущество изобретения заключается в разработке нового подхода для лечения рака предстательной железы. 7 н. и 20 з.п. ф-лы, 7 ил.

1 AGAAAGGGT GCGGCAGCAC TGCCAGGGA AGAGGTGAT CCGACCCGG
51 GAAGGTCGCT GGCAGGGCG AGTTGGGAAA GCGGCAGCCC CCGCCGCC
101 CGCAGCCCT TCTCCTCCTT TCTCCACGT CCTATCTGCC TCTCGTGA
151 GGCAGGCGG TGCAGCATCC AAGACAGGAG GAACTGCAGC CTCATTGGC
201 GGGCCGGGGC GCGGGCCTCG GGCTTAAATA GGAGCTCCGG GCTCTGGCTG
251 GGACCCGACC GCTGCCGGCC GCGCTCCCGC TGCTCCTGCC GGGTGATGA
301 AAACCCAGC CCGCCGCGG CCCTGGGCAA GGCCTCTGC GCTCTCCTC
351 TGGCCACTCT CCGCGCCGCC GGCAGCCTC TTGGGGGAGA GTCCATCTGT
401 TCCGCCGAG CCCCGCCAA ATACAGCATC ACCTTCACGG GCAAGTGGAG
451 CCAGACGGCC TTCCCAAGC AGTACCCCT GTTCCGCC CCGCCAGT
501 GGTCTTGGCT GCTGGGGCC GCGCATAGCT CCGACTACAG CATGTGGAG
551 AAGAACCAGT ACGTCAGTAA CGGGCTGCG GACTTTGCG AGCCGGCGA
601 GGCTGGGCG CTGATGAAG AGATCGAGG GCGGGGGAG GCGCTGCAGA
651 GCGTGACGC GGTGTTTTCG GCGCCCGCG TCCCAGCG CACCGGGCAG
701 ACGTCGGCG AGCTGCAGT GCAGCCAGC CACTCGCTG TCTCCTTGT
751 GGTGCCCATC GTGCCAGCC CCGACTGGT CGTGGGGCTG GACAGCCTGG
801 ACCTGTCCA CCGGGACCGT TGGCGGGAAC AGGGGGCGT GGACCTGTAC
851 CCCTACGAG CCGGGACGGA CAGCGGCTC ACCTTCTCT CCCCCAATT
901 CGCCACCATC CCGCAGGACA CGGTGACCGA GATAACGTCC TCCTCTCCA
951 GCCACCCGC CAACTCCTTC TACTACCCAC GGCTGAAGC CCTGCCTCC
1001 ATCGCCAGG TGACACTGGT GCGGCTGCGA CAGAGCCCA GGCCTTCAT
1051 CCCTCCGCC CCAGTCTGC CCAGCAGGA CAATGAGATT GTAGACAGG
1101 CCTCAGTTC AGAAACGCC CTGGACTGCG AGGTCTCCT GTGGTCGTCC
1151 TGGGACTGT GCGGAGGCA CTGTGGGAG CTCGGGACCA AGAGCAGGAC
1201 TCGCTACGTC CGGGTCCAGC CCGCCAACA CCGGAGCCC TGCCCCGAGC
1251 TCGAAGAAGA GGCTGAGTC GTCCCTGATA ACTGCTCTA AGACCAGAGC

ФИГ. 1



FEDERAL SERVICE FOR INTELLECTUAL PROPERTY, PATENTS AND TRADEMARKS

- (51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

- (21), (22) Application: 2002119208/15, 15.12.2000
(24) Effective date for property rights: 15.12.2000
(30) Priority: 07.12.2000 US 09/732,357
(43) Application published: 27.02.2004
(45) Date of publication: 10.09.2006 Bull. 25
(85) Commencement of national phase: 16.07.2002
(86) PCT application: US 00/33901 (15.12.2000)
(87) PCT publication: WO 01/44291 (21.06.2001)

Mail address: 101000, Moskva, Malyj Zlatoustinskij per., 10, kv.15, "EVROMARKPAT", pat.pov. N.V.Kuzenkovo

- (72) Inventor(s): KhARKINZ Richard (US), PARKEZ Debora (US), PARRI Gordon (US), ShNEJDER Duglas U. (US), ShTAJNBREKHER Renate (US)
(73) Proprietor(s): ShERING AKTsiENGEZEL'ShAFT (DE)

(54) DNA ENCODING NEW RGI PEPTIDE

(57) Abstract: FIELD: medicine, biotechnology. SUBSTANCE: invention relates to antibodies specifically binding to new human extracellular matrix polypeptides called as RGI; immunoconjugate containing the same and method for selective cell degradation; method for treatment of prostates cancer and metastasis in patients suffering from prostates cancer. EFFECT: new method for treatment of prostates cancer. 28 cl, 7 ex, 7 dwg

1 AGAAAGGGGT GGGCAGCAC TGGCAGGGA AGAGGTCAT CCGACCGGG
51 GAAGTCCCT GGGCAGGGG AGTGGGAAA GGGCAGGCC CCGCCCGCC
101 CGAGCCCT TCTCTCTT TCTCCACCT CCTATCTGC TCTCGCTGA
151 GCGCAGGCG TCGAGCATG AAGACAGAG GAATGAGG CTAATGGCC
201 GCGCCGGGG GCGGCGCTG GGTAAATA GAGGTCGG GCTCTGGCTG
251 GGACCGGAC GCTGCGGGC GCGTCCGCG TCTCTCTGC GGTGATGA
301 AAACCCGAG CCGGCGGGC CCGTGGCAA GCGCTCTGC GCTCTCTCC
351 TGGCACTCT GGGCGCGCC GCGCAGCTC TGGGCGAGA GTCACTCTT
401 TCGCCGGAG CCGGCGCAA ATACAGCAT ACCTCACGG GCAATGGAG
451 CGAGCGGCC TTCCGAGC AGTACCGCT GTTCCGCCC CCGTCCGCT
501 GGTCTTCTT GCTGGGGCC GCGCATAGT CCGACTACG CATCTGGAG
551 AAGAACCAGT ACCTAGTAA CCGGCTGGC GACTTTGGG AGCGGGGGA
601 GCGTGGGCG CTGATGAAG AGATGAGGC GCGGGGAG CCGCTCGAA
651 GCGTGCAGC GGTGTTTTC GCGCGGGCC TCGGCGGG CAGCGGGGAG
701 AGCTCGGGC AGCTGAGGT GCGCGGAG CACTCGCTG TCTCTTCTT
751 GGTGGGAGC GTGGCGAGC CCGACTGTT CPTGGGGTG GACAGCTTG
801 ACCTGTGGA CCGGAGCCT TGGCGGAA CCGCGGCTT GACCTCTAC
851 CCTACGAGC CCGGAGGGA CAGCGGCTC ACCTCTCTT CCGGCAACT
901 CGCCACATC CCGGAGGGA CCGTACCGA GATACCTCC TCTCTCCCA
951 GCGACCGGC CAACTCTTC TACTACCCAC GCGTAAAGG CCGCTCTCC
1001 ATCGCCAGG TGACTCTGT CCGGTCGGA CAGAGCCCA GGGCTTCTT
1051 CCGTCCCGC CCGTCTCTC CCGAGGGA CAATGAGAT TTAGACAGG
1101 CCTCAGTTC AGAAAGCGG CTGGACTGG AGGTCTCTT GTGGTCTTC
1151 TGGCACTGT GCGGAGGCA CTGTGGAGG CTGGGAGCA AGAGGAGAC
1201 TCGTACTGT CCGTCCAGC CCGGCAAAA CCGGAGCCC TCGCGGAGC
1251 TCGAAGAAG GCGTACTGC GTCCGTGATA ACTCGCTTA AGCCAGAGC

Ф.П. 1

RU 2 283 130 C2

RU 2 283 130 C2

Настоящее изобретение притязает на эффект предварительной заявки на патент US №60/172370, поданной 16 декабря 1999 г., которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники изобретения

5 Изобретение относится, в частности, к новым полинуклеотидам и полипептидам; вариантам и производным полинуклеотидов и полипептидов; способам получения полинуклеотидов и полипептидов и их вариантов и производных; антителам к полипептидам, их вариантам и производным; и к применению полинуклеотидов, полипептидов, вариантов, производных и антител. В частности, согласно этим и другим
10 объектам изобретение относится к новым полипептидам человеческого внеклеточного матрикса (обозначенным как RG1), полинуклеотидам, которые кодируют эти полипептиды, антителам к этим полипептидам и антисмысловым полинуклеотидам, которые блокируют экспрессию RG1.

Предпосылки создания изобретения

15 Рак предстательной железы представляет собой часто встречающееся у мужчин заболевание, которое обнаруживают примерно у одной трети мужчин старше 45 лет. Имеются данные, что причина заболевания может иметь как генетическую основу, так и обуславливаться факторами, связанными с окружающей средой, причем, в большинстве случаев заболевание, вероятно, является результатом обеих причин. Изучение семейного
20 рака позволило предположить, что генетическая предрасположенность играет роль примерно у 5-10% всех больных, страдающих раком предстательной железы, и примерно у 45% мужчин моложе 55 лет.

Имеются доказательства того, что рак предстательной железы развивается в виде болезни, включающей несколько стадий, причем одним из ранних нарушений является
25 простатическая интраэпителиальная неоплазия (ПИН). Ранние стадии болезни зависят от андрогена, а поздние стадии не зависят от гормонов. Проллиферативное заболевание предстательной железы, известное как доброкачественная гиперплазия, часто обнаруживают в клинических условиях, но оно, вероятно, не является одной из стадий развития рака. Однако оно часто связано с раком предстательной железы. Рак
30 предстательной железы часто является многолокусным, как правило, он медленно развивается и является гетерогенным. На поздних стадиях рака часто образуются метастазы в лимфатических узлах и костной ткани.

Рак предстательной железы, как правило, диагностируют при физическом обследовании и по уровням в сыворотке антигена предстательной железы (PSA). При локализованной
35 болезни в качестве лечения используют радикальную простатэктомию. Лечение развившегося метастатического заболевания в настоящее время осуществляют путем удаления из организма андрогена с помощью орхиэктомии или лечения с использованием GnRF (гонадопропин-релизинг-фактор) или с помощью антиандрогенной терапии. Однако развившееся заболевание практически всегда становится устойчивым к действию
40 гормонов, и оно не поддается лечению. Кроме того, известны серьезные побочные воздействия, связанные как с радикальной простатэктомией, так и с лечением, основанным на удалении из организма андрогена. Они включают высокий риск возникновения инконтиненции и импотенции, связанных с радикальной простатэктомией, и переломы костей и остеопороз, связанные с лечением, основанным на удалении из
45 организма андрогена.

Таким образом, существует большая потребность в развитии новых терапевтических подходов к лечению рака предстательной железы как на ранних, так и на поздних стадиях развития. Также существует необходимость в разработке новых диагностических агентов, в частности агентов, позволяющих различать стадии болезни, поскольку это в
50 значительной степени определяет выбор лечения. Например, если болезнь распространяется за пределы предстательной железы и метастазирует в лимфатические узлы, то радикальная простатэктомия не показана, поскольку она не оказывает воздействия на развитие болезни, но может привести к серьезным нежелательным

побочным действиям. Агент, с помощью которого можно обнаружить метастазы *in vivo*, имеет очень важное значение.

При раке предстательной железы выявлены изменения экспрессии специфических протеинов, включая аномальную экспрессию p53 на последней стадии рака предстательной железы, пониженные уровни рецепторов TGF- β , пониженные уровни Е-кадгерина, С-Sam (молекула клеточной адгезии) и некоторых интегринов. Экспрессия онкогена bcl-2 резко повышается на последней стадии развития не зависящих от андрогена опухолей, и прогноз для пациентов, у которых экспрессируются повышенные уровни bcl-2, является весьма плохим. В то время как указанные выше изменения экспрессии генов хорошо описаны во многих публикациях, не были выявлены никакие изменения экспрессии, являющиеся причиной заболевания. Отсюда следует важность идентификации новых протеинов, экспрессия которых связана с присутствием или развитием опухолей предстательной железы, которые могут служить в качестве молекулярных мишеней для диагностики и терапии рака предстательной железы.

В настоящем описании представлен новый гомолог суперсемейства протеинов внеклеточного матрикса. Этот гомолог, а именно RG1, экспрессируется в ткани предстательной железы, и в опухолях предстательной железы может наблюдаться его сверхэкспрессия.

Внеклеточный матрикс представляет собой сложную сеть коллагена и эластина, погруженную в вязкоупругую основу, состоящую из протеогликанов и гликопротеинов. Матрикс представляет собой трехмерный поддерживающий каркас, который разделяет тканевые компартменты, опосредует соединение клеток и определяет архитектуру ткани (Bissel и др., *J. Theor. Biol.*, 99: 31-68, 1982; Carlson и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2403-2406, 1981). Матрикс действует подобно макромолекулярному фильтру (Hay E.D., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, Plenum Press, 1982), а также влияет на дифференцировку, митогенез и морфогенез клеток (Gospodarowicz D., *Cancer Res.*, 38: 4155-4171, 1978). Биохимические взаимодействия между нормальными клетками и матриксом при неоплазии могут изменяться и это может влиять на пролиферацию опухоли. Опухолевые клетки могут взаимодействовать с матриксом различными путями. Во-первых, опухолевые клетки могут прикрепляться к матриксу посредством специфичных для плазматической мембраны рецепторов (Terranova и др., *Cancer Res.*, 42: 2265-2269, 1982). Во-вторых, каскадом ферментов, которые присущи опухолевой клетке и хозяину, опосредуется разложение матрикса (Eisen и др., *Bioch. Biophys. Acta*, 151: 637-645, 1968). В-третьих, в дифференцированных областях опухолей опухолевые клетки могут синтезировать и накапливать матрикс или индуцировать у клеток-хозяев способность накапливать избыточный матрикс (Brownstein и др., *Cancer*, 40: 2979-2986, 1977).

RG1 имеет гомологию с суперсемейством протеинов внеклеточного матрикса, кодируемыми генами Mindin/F-spondin (Миндин/F-спондин). Общим для семейства генов является наличие двух консервативных доменов спондина, т.е. FS1 и FS2, вблизи N-конца и по меньшей мере одного повтора тромбоспондина типа 1 (TSR1) на C-конце (Shimeld S.M., *Mol. Biol. Evol.*, 15(9): 1218-1223, 1998). TSR-мотив впервые был обнаружен в протеинах внеклеточного матрикса позвоночных (Bornstein P., *J. Cell Biol.*, 130: 503-506, 1995), а затем был выявлен в некоторых других протеинах внеклеточного матрикса. Существует ряд доказательств того, что TSR опосредуют клеточную адгезию и играют решающую роль в генезе опухолей. Например, было установлено, что содержащие TSR протеолитические фрагменты тромбоспондина и синтетические пептиды, имеющие последовательности, соответствующие области TSR тромбоспондина, усиливают адгезию и метастазирование опухолевых клеток (Prater и др., *J. Cell Biol.*, 112: 1031-1040, 1991; Tuszynski и Nicosia, *BioEssays*, 18: 71-76, 1996), обладают антиангиогенной активностью (Tolsma и др., *J. Cell Biol.*, 122: 497-511, 1993) и ингибируют агрегацию тромбоцитов и метастазирование меланом (Tuszynski и др., *J. Cell Biol.*, 116: 209-217, 1992).

К настоящему времени обнаружены представители этого суперсемейства, включающие

ген *Caenorhabditis elegans*, один ген *Drosophila* и множество генов позвоночных. У *C. elegans* ген F.10E7.4 кодирует 5 TSR помимо FS1- и FS2-доменов (Higashijima и др., *Dev. Biol.*, 192: 211-227, 1997). У *Drosophila* представитель семейства, обозначенный как M-спондин (*mspo*), содержит FS1- и FS2-домены и один TSR (Umehiya и др., *Dev. Biol.*, 186: 165-176, 1997). Ген M-спондина кодирует секретлируемый протеин, локализованный в местах прикрепления мышц, и, вероятно, выполняет функцию протеина внеклеточного матрикса, который поддерживает соединение мышца-аподема. Представители семейства, обнаруженные у позвоночных, включают гены, выделенные из полосатой перцины (Миндин1 и Миндин2, F-спондин1 и F-спондин2), крысиный F-спондин, F-спондин *Xenopus* и крысиный Миндин. Миндин1 и Миндин2 весьма похожи и имеют генную структуру, аналогичную гену M-спондина *Drosophila*. Гены Миндин1 и Миндин2 оба кодируют один TSR помимо FS1- и FS2-доменов (Higashijima и др., *Dev. Biol.*, 192: 211-227, 1997). Все гены, такие как F-спондин 1 и P-спондин2 полосатой перцины, крысиный F-спондин (Klar и др., *Cell*, 69: 95-110, 1992) и F-спондин *Xenopus* (Altaba и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8268-8272, 1992), имеют сходную структуру, кодируют 6 копий TSR помимо FS1- и FS2-доменов. У позвоночных животных суперсемейство Миндин/F-спондин можно разделить на 2 группы: гены, обладающие значительным сходством с исходными крысиными генами F-спондина и Миндина, и гены, обладающие значительным сходством с геном M-спондина *Drosophila*. У позвоночных как гены Миндина, так и гены F-спондина, кодируют протеины, которые главным образом экспрессируются вентральной пластинкой нервной трубки в процессе эмбрионального развития.

В настоящее время один ген, родственник гену F-спондина, т.е. Amphif-спондин, был выделен из ланцетника *Amphioxus* (Shimeld S.M., *Mol. Biol. Evol.*, 15(9): 1218-1223, 1998). На основе молекулярных филогенетических данных установлено, что Amphif-спондин является близким аналогом определенной подгруппы генов типа F-спондина позвоночных, которые кодируют шесть TSR. Amphif-спондин кодирует три TSR и два повтора фибронектина типа III, один из которых в значительной степени идентичен повтору фибронектина типа III из Deleted in Colorectal Cancer (DCC). Экспрессия протеина обнаружена в большей части центральной нервной системы и не ограничена средней линией, как это известно для протеинов Миндина и F-спондина позвоночных.

Эти данные позволяют предположить, что протеины внеклеточного матрикса, такие как новый протеин RG1, который является гомологом суперсемейства Миндина/F-спондина, могут оказаться перспективными агентами для диагностики рака и терапевтического вмешательства.

35 Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к уникальной полинуклеотидной последовательности, которая кодирует новый протеин, обозначенный как RG1. Полипептиды RG1 обладают гомологией с крысиным протеином внеклеточного матрикса миндином. Он содержит гидрофобную сигнальную последовательность на N-конце, два домена спондина (FS1- и FS2) и повтор тромбоспондина типа 1 на C-конце. RG1 на 89,7% аналогичен крысиному миндину. Полинуклеотидная последовательность, обозначенная в настоящем описании как *rg1* и представленная на фиг.1 (SEQ ID NO:1), кодирует аминокислотную последовательность RG1, которая приведена на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

45 Таким образом, объектом настоящего изобретения являются полипептиды, которые среди прочего идентифицированы в качестве новых протеинов, имеющих гомологию с семейством протеинов внеклеточного матрикса типа миндин, что подтверждено сравнительным анализом аминокислотной последовательности, приведенной на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и известных аминокислотных последовательностей других протеинов внеклеточного матрикса.

50 Еще одним объектом изобретения являются полинуклеотиды, которые кодируют такие полипептиды, в частности, полинуклеотиды, которые кодируют полипептид, обозначенный в контексте настоящего описания как RG1.

В соответствии с этим объектом изобретение относится к выделенным

полинуклеотидам, которые кодируют RG1, включая мРНК, кДНК, а также в дополнительных вариантах этого объекта к их вариантам, аналогам или производным, включая их фрагменты, включая фрагменты вариантов, аналогов и производных, которые обладают ценными биологическими, диагностическими, клиническими или терапевтическими свойствами.

Особенно предпочтительными вариантами этого объекта являются встречающиеся в естественных условиях аллельные варианты полинуклеотидов, которые кодируют варианты полипептида, обозначенного в контексте настоящего описания как RG1.

Таким образом, объектом изобретения являются новые человеческие полипептиды, обозначенные в контексте настоящего описания как RG1, а также их варианты и производные, включая варианты и производные фрагментов, и их аналоги, пригодные с биологической, диагностической или терапевтической точек зрения.

Одним из наиболее предпочтительных вариантов этого объекта изобретения являются варианты RG1, кодируемые встречающимися в естественных условиях аллельными вариантами полинуклеотида rg1.

И еще одним объектом изобретения является способ получения вышеуказанных полипептидов, фрагментов полипептидов, вариантов и производных, фрагментов вариантов и производных и их аналогов. Согласно предпочтительному варианту этого объекта изобретение относится к способам получения вышеуказанных пептидов RG1, который предусматривает культивирование клеток-хозяев, обладающих способностью экспрессировать включенный в них кодирующий RG1 полинуклеотид экзогенного происхождения в условиях, предназначенных для экспрессии человеческого RG1 в хозяине, и затем выделение экспрессированного полипептида.

Следующим объектом изобретения являются продукты, композиции, процессы и методы, с помощью которых вышеуказанные полипептиды и полинуклеотиды применяют среди прочего для исследовательских, биологических, клинических и терапевтических целей.

Определенными предпочтительными вариантами этого объекта изобретения являются продукты, композиции, процессы и методы, предназначенные среди прочего для оценки экспрессии RG1 в клетках путем обнаружения полипептидов RG1 или кодирующей RG1 мРНК; и оценки генетических вариаций и аномалий, таких как дефекты, в генах rg1.

Определенными предпочтительными вариантами этого и других объектов являются зонды, которые гибридизуются с последовательностями rg1.

И еще одним объектом изобретения являются антитела, обладающие высокой селективностью в отношении полипептидов RG1 или их фрагментов и которые можно применять в методе диагностики и/или обнаружения экспрессии RG1, которая может быть связана с раком предстательной железы. Согласно определенным предпочтительным вариантам этого объекта изобретения антитела метят таким образом, чтобы получить сигнал, который можно обнаружить. Особенно предпочтительными являются антитела, меченные с помощью радиоактивного изотопа, фермента, хромофора или флуоресцирующего агента.

И еще одним объектом изобретения являются антитела, конъюгированные с терапевтическим агентом, с целью введения в клетки *in vitro*, в клетки *ex vivo* и в клетки *in vivo* или в многоклеточный организм. В этом плане особенно предпочтительными являются терапевтические агенты, обладающие цитотоксическим действием. Согласно определенным предпочтительным вариантам такие конъюгированные антитела вводят больным людям для лечения болезненного состояния, для которого характерны активность или экспрессия RG1, такого как рак предстательной железы.

И еще одним объектом изобретения являются пептиды и антиидиотипические антитела, которые можно применять для стимулирования иммунного ответа.

Следующим объектом изобретения являются рибозимы и полинуклеотиды, комплементарные полинуклеотидам rg1 (т.е. антисмысловые полинуклеотиды), предназначенные для введения в клетки *in vitro*, в клетки *ex vivo* и в клетки *in vivo*

или в многоклеточный организм. В этом плане особенно предпочтительным является введение больным людям антисмысловых молекул с целью лечения болезненного состояния, такого как рак предстательной железы или доброкачественная гиперплазия предстательной железы, которое облегчается при снижении уровня активности RG1.

5 Другие объекты, особенности, преимущества и аспекты настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области из приведенного ниже описания. Однако следует понимать, что приведенное ниже описание и конкретные примеры, в которых представлены предпочтительные варианты осуществления изобретения, даны только с целью иллюстрации. Без ограничения сущности и объема изобретения могут быть внесены
10 различные изменения и модификации, которые станут очевидны специалистам в данной области после ознакомления с приведенным ниже описанием и другими разделами изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг.1: Полинуклеотидная последовательность rg1 (SEQ ID NO:1), которая кодирует
15 биологически или иммунологически активную форму RG1.

Фиг.2: Выведенная аминокислотная последовательность RG1 (SEQ ID NO:2) с доменами F-спондина (подчеркнуты простой линией) и доменом тромбоспондина (подчеркнут двойной линией).

Фиг.3: Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей RG1 и крысиного
20 миндина. Последовательность RG1 приведена сверху.

Фиг.4: Полинуклеотидная и выведенная аминокислотная последовательности RG1.

Фиг.5: Экспрессия мРНК rg1 в тканях человека, оцененная с помощью ПЦР на основе Taqman-метода. Из тканей человека, как опухолевых, так и здоровых, выделяли РНК стандартными методами. Праймеры и зонд для обнаружения экспрессии мРНК rg1
25 конструировали с помощью программы Perkin Elmer's Primer Express и синтезировали с помощью Synthetic Genetics. мРНК rg1 была обнаружена в тканях предстательной железы человека. Существенно более низкий уровень экспрессии мРНК rg1 выявлен в других тканях, например, печени.

Фиг.6: Очистка нативного протеина RG1, секретируемого клетками линии LNCap. Для
30 обнаружения нативного протеина RG1, секретируемого клетками линии LNCap, осуществляли анализ методом Вестерн-блоттинга с использованием антисыворотки, полученной путем иммунизации синтетической пептидной последовательностью RG1 (3С, SEQ ID NO:10; см. пример 4). На чертеже представлены фракции, элюированные при осуществлении хроматографии на Q-сефарозе концентрированной кондиционированной
35 среды для клеток линии LNCap: (L) - загрузка колонки, (F) - разгонка в колонке, (1-12) - фракции, элюированные с помощью солевого градиента. Предсказанная молекулярная масса RG1 составляет ~36 кД, однако установлено, что для протеина RG1, экспрессия которого происходила в бактериальных клетках, в ВНК (клетки почки детеныша хомяка) и в клетках линии LNCap, во всех случаях миграция на ПААГ соответствовала ~45
40 кДа (L, фракции 6-9).

Фиг.7: Иммуногистохимическое окрашивание с целью обнаружения экспрессии RG1 в
тканях предстательной железы человека. Ткань предстательной железы получали из
отделения урологии медицинской школы Стэнфордского университета (Urology Department
at Stanford University School of Medicine). Окрашивание осуществляли с помощью набора
45 Vector ABC-AP (AK5002). Визуализацию окрашивания осуществляли с помощью набора Vector Red substrate (SK-5100), а контрастное окрашивание проводили с помощью гематоксилина. Результаты свидетельствуют о выраженном окрашивании перилуминальной мембраны в железистых образованиях.

Подробное описание изобретения

50 Определения

В описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения, если не указано иное, следующие понятия имеют указанные ниже значения:

Понятие "RG1" обозначает полипептид, имеющий аминокислотную последовательность,

представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2); его варианты, аналоги, производные и фрагменты и фрагменты вариантов, аналогов и производных. Понятия "фрагмент", "производное" и "аналог" по отношению к полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2), обозначают полипептид, который в значительной степени сохраняет биологическую и/или иммунологическую активность, присущую полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

Понятие "rg1" обозначает полинуклеотид, имеющий последовательность, представленную на фиг.1 (SEQ ID NO:1), и полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность RG1, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2); и полинуклеотиды, кодирующие варианты, аналоги, производные и фрагменты RG1 и фрагменты вариантов, аналогов и производных. Понятие "rg1" также обозначает полинуклеотиды, включающие РНК, а также полинуклеотиды, комплементарные полинуклеотидам, которые кодируют полипептидную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

Понятие "полинуклеотид(ы)" в целом относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Так, например, в контексте настоящего описания понятие полинуклеотид обозначает среди прочего одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одно- и двухцепочечных участков, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных участков, гибридные молекулы, включающие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или более часто двухцепочечными или представляют собой смесь одно- и двухцепочечных участков. Кроме того, в контексте настоящего описания полинуклеотиды обозначают трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК или РНК и ДНК. В таких областях цепи могут состоять из одних и тех же молекул или из различных молекул. Области могут включать все, т.е. одну или несколько молекул, однако обычно область включает только несколько молекул. Одна из молекул трехспиральной области часто представляет собой олигонуклеотид.

В контексте настоящего описания понятие "полинуклеотид" включает ДНК или РНК, как описано выше, которые содержат одно или несколько модифицированных оснований. Так, под указанное понятие "полинуклеотиды" подпадают ДНК и РНК, каркасы которых модифицированы с целью придания стабильности или по иным причинам. Кроме того, под понятие "полинуклеотиды" подпадают ДНК и РНК, которые включают необычные основания, такие как инозин, или модифицированные основания, такие как меченные с помощью трития основания, причем, два указанных примера не ограничивают объем изобретения.

Подразумевается, что в ДНК и РНК можно вводить широкое разнообразие модификаций, известных специалистам в данной области, с целью придания им ценных свойств. В контексте настоящего описания под понятие "полинуклеотид" подпадают такие химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, включая среди прочего простые и сложные клетки.

Понятие "полипептиды" в контексте настоящего описания включает все описанные ниже полипептиды. Основная структура полипептидов хорошо известна в данной области и описана в очень большом количестве учебников и других публикаций. В этом контексте используемое в данном описании понятие относится к любому пептиду или протеину, которые содержат 2 или более аминокислот, соединенных друг с другом в виде линейной цепи с помощью пептидных связей. В контексте настоящего описания понятие относится как к полипептидам с короткой цепью, которые обычно в данной области называют, например, пептидами, олигопептидами и олигомерами, так и к полипептидам с более длинной цепью, которые, как правило, в данной области называют протеинами и которые включают много типов.

Подразумевается, что полипептиды часто включают аминокислоты, отличные от 20

аминокислот, обычно обозначаемых как 20 встречающихся в естественных условиях аминокислот, и что многие аминокислоты в данном полипептиде, включая концевые аминокислоты, можно модифицировать либо с помощью естественных процессов, таких как гликозилирование и другие посттрансляционные модификации, либо с помощью методов химической модификации, хорошо известных в данной области. Даже обычные модификации, происходящие в полипептидах в естественных условиях, являются слишком многочисленными, для того чтобы перечислить их полностью в данном описании, но они подробно описаны в основных учебниках и в более подробных монографиях, также в обширной научной литературе и хорошо известны специалистам в данной области. Среди известных модификаций, которые могут присутствовать в полипептидах по настоящему изобретению, с целью иллюстрации можно указать некоторые, в том числе ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение фрагмента гема, ковалентное присоединение полинуклеотида или производного полинуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфотидилинозитола, поперечное связывание, циклизацию, образование дисульфидного мостика, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксипирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к протеинам, такое как аргинилирование и убикитинирование.

Такие модификации хорошо известны специалистам в данной области и подробно описаны в научной литературе. Некоторые наиболее распространенные модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксипирование и АДФ-рибозилирование, описаны, например, в большом количестве известных учебников, например, у I.E.Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2-е изд., W.H.Freeman and Company, New York, 1993. Этому предмету посвящены многие обширные обзоры, такие, например, как представленные Wold F. в: *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, ред. B.C.Johnson, Academic Press, New York, стр.1-12, 1983; Seifter и др., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 и Rattan и др.. *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 48-62, 1992.

Как это хорошо известно и указано выше, подразумевается, что полипептиды не всегда являются полностью линейными. Например, полипептиды могут быть разветвленными в результате убикитинизации, и они могут быть кольцевыми и иметь разветвления, как правило в результате посттрансляционных процессингов, включая встречающиеся в естественных условиях случаи процессинга и случаи, являющиеся результатом манипуляций человека, которые не происходят в естественных условиях, или не иметь разветвлений. Кольцевые, разветвленные и разветвленные кольцевые полипептиды могут быть синтезированы с помощью нетрансляционных встречающихся в естественных условиях процессов, а также только путем синтеза.

Модификации могут затрагивать любые области полипептида, включая каркас пептида, аминокислотные боковые цепи и N- или C-концы. Как правило блокада в полипептиде amino- или карбоксильной группы или обеих этих групп путем ковалентных модификаций является обычной для встречающихся в естественных условиях и синтетических полипептидов, и такие модификации могут также присутствовать в полипептидах по настоящему изобретению. Например, аминоконцевой остаток полипептидов, полученных в *E.coli*, до протеолитического процессинга почти всегда представляет собой N-формилметионин.

Модификации, которые могут иметь место в полипептиде, часто зависят от того, каким образом он получен. Для полипептидов, полученных, например, в результате экспрессии

клонированного гена в хозяине, природа и степень модификаций в большей части определяются способностью клетки-хозяина к посттрансляционной модификации и наличием сигналов модификации в аминокислотной последовательности полипептида. Например, как хорошо известно, гликозилирование часто не имеет места в бактериях-хозяевах, таких как *E.coli*. Таким образом, когда требуется гликозилирование, полипептид необходимо экспрессировать в хозяине, для которого характерно гликозилирование, как правило, в эукариотической клетке. В клетках насекомых часто происходят такие же посттрансляционные процессы гликозилирования, что и в клетках млекопитающих, и по этой причине были разработаны системы экспрессии, на основе клеток насекомых, которые применяли для эффективной экспрессии протеинов млекопитающих, имеющих среди прочего естественные схемы гликозилирования. Аналогичные соображения применимы к другим модификациям.

Подразумевается, что один и тот же тип модификации может присутствовать в такой же или в другой степени в нескольких областях данного полипептида. Кроме того, данный полипептид может включать много типов модификаций.

В целом, в контексте настоящего описания понятие полипептид включает все такие модификации, в частности модификации, которые присутствуют в полипептидах, синтезированных путем экспрессии полинуклеотида в клетке-хозяине.

Понятие "полинуклеотид, кодирующий полипептид" в контексте настоящего описания включает полинуклеотиды, которые содержат последовательность, кодирующую полипептид по настоящему изобретению, в частности полипептид RG1, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную на фиг.2 (SEQ ID NO:2). Понятие включает полинуклеотиды, которые содержат одну непрерывную область или прерывистые области, кодирующие полипептид (например, прерванные интронами), в сочетании с другими областями.

Понятие "биологически активный" относится к структурным, регуляторным или биохимическим функциям встречающегося в естественных условиях полипептида RG1.

Понятие "иммунологическая активность" обозначает способность встречающегося в естественных условиях рекомбинантного или синтетического RG1 или любого его фрагмента вызывать специфический иммунный ответ у соответствующих животных или в клетках и связываться со специфическими антителами.

Понятие "олигонуклеотид(ы)" относится к относительно коротким полинуклеотидам. Часто понятие относится к одноцепочечным дезоксирибонуклеотидам, но оно также может относиться как к одно-, так и к двухцепочечным рибонуклеотидам, гибридам РНК:ДНК и среди прочего к двухцепочечным ДНК. Олигонуклеотиды, такие как олигонуклеотидные зонды, представляющие собой одноцепочечную ДНК, часто синтезируют химическими методами, например, с помощью автоматических синтезаторов олигонуклеотидов. Однако олигонуклеотиды также можно получать с помощью различных других методов, включая методы *in vitro*, основанные на применении рекомбинантной ДНК, и с помощью экспрессии ДНК в клетках и организмах. Понятия "олигонуклеотиды" или "олигомеры" или полинуклеотидный "фрагмент", "участок" или "сегмент" относятся к полинуклеотидной последовательности, состоящей по меньшей мере из 10 нуклеотидов и максимум примерно из 60 нуклеотидов, предпочтительно примерно из 15-30 нуклеотидов и наиболее предпочтительно примерно из 20-25 нуклеотидов.

Понятие "встречающийся в естественных условиях RG1" относится к RG1, который продуцируется человеческими клетками, которые не были получены с помощью генетической инженерии, и включает различные формы RG1, образовавшиеся в результате посттрансляционных модификаций полипептида, включая (но не ограничиваясь ими) ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, присоединение липидов (липидацию), ацилирование и расщепление.

Понятие "вариант(ы)" полинуклеотидов или полипептидов в контексте настоящего описания обозначает полинуклеотиды или полипептиды, которые отличаются от полинуклеотида или полипептида, с которым проводится сравнение (эталонного)

соответственно. Такие варианты описаны более детально ниже и в других разделах настоящего описания.

(1) Полинуклеотид, который отличается по нуклеотидной последовательности от другого эталонного полинуклеотида. Как правило, различия ограничены тем, что эталонная
5 полинуклеотидная последовательность и последовательность варианта весьма схожи в целом и во многих областях идентичны.

Как будет описано ниже, замены в полинуклеотидной последовательности варианта могут быть молчащими. Это означает, что они могут не изменять аминокислотные последовательности, кодируемые полинуклеотидом. Если изменения ограничены
10 молчащими заменами, то вариант этого типа может кодировать полипептид с такой же аминокислотной последовательностью, что эталонный полинуклеотид. Как будет описано ниже, замены в полинуклеотидной последовательности варианта могут изменять аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого эталонным
15 полинуклеотидом. Такие замены в полинуклеотиде могут привести к аминокислотным заменам, добавлениям, делециям, слияниям и усечениям в полипептиде, кодируемом эталонным полинуклеотидом, что будет пояснено ниже.

(2) Полипептид, который отличается по аминокислотной последовательности от другого эталонного полипептида. Как правило, различия ограничены тем, что эталонные последовательности и вариант весьма схожи в целом и во многих областях идентичны.
20 Вариант и эталонный полипептид могут отличаться наличием в аминокислотной последовательности одной или нескольких замен, добавлений, делеций, слияний и усечений, которые могут присутствовать в любой комбинации. Рекомбинантные варианты, кодирующие одинаковые или аналогичные полипептиды, могут быть получены с помощью синтеза или отобраны на основе "избыточности" (вырожденности) генетического кода.
25 Различные замены кодонов, такие как молчащие замены, которые образуют различные сайты рестрикции, можно вводить с целью оптимизации клонирования в плазмидном или вирусном векторе или экспрессии в конкретной прокариотической или эукариотической системе. Также можно создавать мутации с целью изменения свойств полипептида, изменения аффинностей в отношении связывания лигандов, межцепочечных аффинностей
30 или деградации полипептида, или интенсивности круговорота.

Понятие "аллельный вариант" обозначает альтернативную форму полинуклеотида rg1. Аллели образуются в результате мутации, т.е. изменения полинуклеотидной последовательности, и обычно продуцируют измененные мРНК или полинуклеотиды, структура или функция которых может быть изменена или не изменена. Любой конкретный
35 ген может не иметь вообще, иметь одну или несколько аллельных форм. Общие обусловленные мутациями изменения, которые приводят к получению аллелей, обычно связывают с встречающимися в естественных условиях делециями, добавлениями или заменами нуклеотидов. Каждый из этих типов изменений может встречаться по отдельности или в сочетании друг с другом, один или несколько раз в данной
40 последовательности.

Понятие "производное" относится к полинуклеотидам или полипептидам, выведенным из встречающихся в естественных условиях rg1 или RG1 соответственно, путем химических модификаций, таких как убикитинизация, введение метки (например, с использованием радиоактивных изотопов, различных ферментативных модификаций), ПЭГилирования
45 (дериватизация с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ)) или путем инсерции или замены аминокислот, таких как орнитин (или замены нуклеотидов, которые кодируют такие аминокислоты), которые в норме не встречаются в человеческих протеинах.

Понятие "делеция" обозначает изменение либо полинуклеотидной, либо аминокислотной последовательностей, в результате которого происходит удаление одного
50 или нескольких полинуклеотидов или аминокислотных остатков соответственно.

Понятие "инсерция" или "добавление" обозначает изменение либо полинуклеотидной, либо аминокислотной последовательностей, которое приводит к добавлению одного или нескольких полинуклеотидов или аминокислотных остатков соответственно по сравнению

со встречающимися в естественных условиях полинуклеотидной или аминокислотной последовательностью.

"Замена" приводит к замещению одного или нескольких полинуклеотидов или аминокислотных остатков другими полинуклеотидами или аминокислотами соответственно.

- 5 Предпочтительно аминокислотные замены представляют собой результат замены одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет аналогичные структурные и/или химические свойства, например, замены лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, или треонина на серин, т.е. представляют собой консервативные замены аминокислот. Инсерции или делеции, как правило, затрагивают примерно 1-5 аминокислот.
- 10 Допустимость вариации можно определять экспериментально путем систематического осуществления инсерции, делеций или замен аминокислот в полипептиде с помощью методов рекомбинантной ДНК и анализа активности полученных рекомбинантных вариантов.

- 15 Понятие "фрагмент" обозначает полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая полностью соответствует части, но не всей аминокислотной последовательности вышеуказанных полипептидов RG1 и их вариантов или производных.

- 20 Полипептидный "фрагмент", "часть" или "сегмент" состоит из последовательных аминокислотных остатков по меньшей мере примерно 5 аминокислот, часто по меньшей мере примерно 7 аминокислот, как правило по меньшей мере примерно 9-13 аминокислот, и в различных вариантах по меньшей мере примерно 17 или более аминокислот.

- 25 Понятие "рекомбинант" или "рекомбинантная молекула ДНК" относится к полинуклеотидной последовательности, которая не встречается в естественных условиях или получена путем искусственной комбинации двух имеющих различное происхождение сегментов последовательности. Под понятием "полученный рекомбинантным путем" подразумевают искусственную комбинацию, часто осуществляемую либо с помощью химического синтеза, либо с помощью искусственного манипулирования выделенными сегментами полинуклеотидов, например, с применением методов генетической инженерии. Такое манипулирование обычно осуществляют для замены кодона "избыточным" (вырожденным) кодоном, который кодирует эту же или консервативную аминокислоту, как
- 30 правило, вводя или удаляя при этом сайт распознавания последовательности. В альтернативном варианте его осуществляют для соединения вместе полинуклеотидных сегментов с требуемыми функциями с получением единого генетического элемента, обладающего требуемой комбинацией функций, которая не встречается в обычных природных формах. Таким путем можно включать сайты, распознаваемые рестриктазами,
- 35 регуляторные последовательности, контролирующие последовательности или другие важные элементы. Понятие "рекомбинантные молекулы ДНК" включает клонирующие и экспрессионные векторы. Понятие "рекомбинант" также может обозначать полинуклеотид, который кодирует полипептид и который получен с помощью методов рекомбинантной ДНК.

- 40 Понятие "выделенный" обозначает измененный с помощью человека относительно своего естественного состояния, т.е., если он встречается в естественных условиях, то он изменен или удален из естественного окружения или и изменен и удален. Например, встречающийся в естественных условиях полинуклеотид или полипептид, в естественных условиях, присутствующий в живом организме в его естественном состоянии, не является "выделенным" в том смысле, в котором используется это понятие в контексте настоящего
- 45 описания. Например, в отношении полинуклеотидов понятие "выделенный" обозначает, что он выделен из хромосомы и клетки, в которой он встречается в естественных условиях.

- 50 Полинуклеотиды и полипептиды могут находиться в составе композиции, такой как композиция в средах, в растворах для интродукции полинуклеотидов или полипептидов, например, в клетки, композиций или растворов для химических или ферментативных реакций, которые, например, не являются встречающимися в естественных условиях композициями, и при этом они подпадают под понятие выделенные полинуклеотиды и полипептиды в том смысле, в котором используется это понятие в контексте настоящего описания.

Понятия "практически очищенный" и "практически гомогенный" используются взаимозаменяемо и относятся к полипептиду RG1, его фрагментам или полинуклеотидному сегменту, кодирующему их, когда такой полипептид или полинуклеотид отделяют от компонентов, с которыми он связан в естественных условиях. Полипептид RG1 или его
5 фрагмент, или сегмент ДНК, кодирующий их, являются практически очищенными от связанных с ними в естественных условиях компонентов, когда они отделены от естественных загрязнителей, которые сопровождают их в естественном состоянии. Так, полипептид, синтезированный химическим путем или синтезированный в клеточной
10 системе, отличной от клетки, в которой он присутствует в природе, должен практически не содержать компонентов, связанных с ним в естественных условиях. Аналогично этому, полинуклеотид, синтезированный химическим путем или синтезированный в клеточной системе, отличной от клетки, в которой он присутствует в природе, должен практически не содержать компонентов, связанных с ним в естественных условиях.

"Гомологичный" при описании полинуклеотида обозначает, что у двух полинуклеотидов
15 или характеризующих их последовательностей при их оптимальном выравнивании и сравнении с учетом соответствующих нуклеотидных inserций или делеций идентичными являются по меньшей мере 70% нуклеотидов, как правило, примерно 75-99% и более предпочтительно примерно по меньшей мере 98-99% нуклеотидов.

"Степень аналогичности" при описании полипептида определяют путем сравнения
20 аминокислотной последовательности и консервативных аминокислотных замен полипептида с последовательностью второго полипептида.

Понятие "полимеразная цепная реакция" или "ПЦР" относится к процедуре, при которой определенные участки ДНК амплифицируют согласно методике, описанной в патенте США
4683195, выданном 28 июля 1987 г. Как правило, необходимо располагать информацией о
25 последовательности концов представляющего интерес полипептидного фрагмента или непосредственно за ними, на основании чего можно сконструировать олигонуклеотидные праймеры; эти праймеры должны быть ориентированы навстречу друг другу и должны быть идентичны или аналогичны последовательности противоположных цепей матрицы, подлежащей амплификации. 5'-концевые нуклеотиды двух праймеров должны
30 соответствовать концам амплифицируемого продукта. ПЦР можно применять для амплификации определенных последовательностей ДНК из общей геномной ДНК, кДНК, транскрибируемой из общей клеточной РНК, последовательностей плазмид и т.д. (см. общие положения у Mullis и др., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987; Erlich ред., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989).

Под понятием "строгость" обычно подразумевают, что температура реакции находится в диапазоне от примерно $t_{пл} - 5^{\circ}C$ (температура на $5^{\circ}C$ ниже температуры плавления ($t_{пл}$) зонда) до температуры примерно на $20-25^{\circ}C$ ниже $t_{пл}$. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что наиболее строгую гибридизацию можно использовать для
40 идентификации или обнаружения идентичных полинуклеотидных последовательностей или для идентификации или обнаружения аналогичных или родственных полинуклеотидных последовательностей. В контексте настоящего описания понятие "строгие условия" обозначает, что гибридизация должна происходить только при наличии по меньшей мере 95%-ной или предпочтительно по меньшей мере 97%-ной идентичности между последовательностями.

Понятие "гибридизация" в контексте настоящего описания может относиться к "любому процессу, с помощью которого полинуклеотидная цепь соединяется с комплементарной цепью посредством спаривания оснований" (Coombs J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, N.Y., 1994).

Понятие "терапевтически эффективная доза" обозначает такое количество полипептида
50 или антител к нему, его антагонистов или ингибиторов, включая антисмысловые молекулы и рибозимы, которое облегчает симптомы или состояния болезни. Терапевтическую активность и токсичность таких субстанций можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур в клеточных культурах или с использованием

экспериментальных животных с определением, например, значений ED₅₀ (доза, обладающая терапевтической эффективностью в отношении 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение между дозами, обладающими терапевтическим и токсическим действиями, представляет собой терапевтический индекс, и его можно выражать в виде соотношения ED₅₀/LD₅₀.

Понятия "лечить" или "лечение" в контексте настоящего описания относятся к лечению болезненного состояния у больных людей, где болезненное состояние связано с ростом опухоли предстательной железы и включает болезненные состояния, при которых пациент нуждается в снижении уровней RG1.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится среди прочего к новым полипептидам RG1, полинуклеотидам rg1 и антителам к полипептидам RG1, что более подробно описано ниже. В частности, изобретение относится к новым полипептидам RG1 и полинуклеотидам, кодирующим эти полипептиды RG1, и прежде всего к RG1, который имеет аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и rg1, который имеет полинуклеотидную последовательность, представленную на фиг.1 (SEQ ID NO:1). Под объем изобретения подпадают также варианты RG1. Предпочтительным вариантом RG1 является вариант, полипептидная последовательность которого по меньшей мере на 70% аналогична (предпочтительно идентична по меньшей мере на 70%) и более предпочтительно по меньшей мере на 90% аналогична (более предпочтительно идентична по меньшей мере на 90%) полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и еще более предпочтительно по меньшей мере на 95% аналогична (еще более предпочтительно идентична по меньшей мере на 95%) полипептидной последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2), а также включает участки таких полипептидов, причем участок полипептида, как правило, содержит по меньшей мере 30 аминокислот и более предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот.

Кодирующая последовательность выведенного полипептида RG1 начинается на расстоянии 296 пар оснований от 5'-конца нуклеотидной последовательности, представленной на фиг.1 (SEQ ID NO:1). RG1 содержит три структурных домена, характерных для протеинов внеклеточного матрикса суперсемейства Миндина/F-спондина: два домена спондина (FS1 и FS2), состоящие из аминокислот 31-103 и 138-221 соответственно, и домен тромбоспондина, состоящий из аминокислот 278-330.

Одним из объектов настоящего изобретения является наличие структурной гомологии, показанной на фиг.3, между RG1 и крысиным миндином, другим представителем семейства протеинов внеклеточного матрикса. Аминокислотная последовательность RG1 примерно на 89,7% аналогична крысиному миндину.

Еще одним объектом настоящего изобретения является профиль экспрессии RG1, в частности его экспрессии в библиотеках линий ткани предстательной железы и сверхэкспрессии в библиотеках линий рака предстательной железы. Этот профиль экспрессии в ткани доказан путем анализа экспрессии мРНК в образцах ткани, представляющих собой здоровые и опухолевые ткани с помощью основанного на ПЦР Taqman-анализа. С помощью этого анализа продемонстрировано, что для мРНК, кодирующей RG1, характерна сверхэкспрессия в тканях предстательной железы по сравнению с другими тканями.

Полинуклеотиды

Одним из объектов настоящего изобретения являются выделенные полинуклеотиды, которые кодируют полипептид RG1, имеющий выведенную аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

На основе приведенных в настоящем описании данных, таких как данные о полинуклеотидной последовательности, представленной на фиг.1 (SEQ ID NO:1), полинуклеотид по настоящему изобретению, кодирующий полипептид RG1, можно получать с помощью стандартных методов клонирования и скрининга, например, описанных для клонирования кДНК с использованием в качестве исходного продукта мРНК,

полученной из клеток ткани человека. Изобретение иллюстрируется тем фактом, что полинуклеотидная последовательность, представленная на фиг.1 (SEQ ID NO:1), обнаружена в клонх кДНК, полученных из ткани предстательной железы человека.

Доказательство экспрессии гена *rg1* в предстательной железе получено на основе базы данных Incyte's LifeSeq. Нуклеотидную последовательность идентифицировали с помощью справочного поиска в базе данных с использованием программного обеспечения "Protein Function", разработанного фирмой Incyte для цели анализа базы данных. Нуклеотидная последовательность обнаружена в категории молекул клеточной адгезии в справочной базе данных и описана в качестве гомолога f-спондина. Осуществленный с помощью ЭВМ Нозерн-анализ распределения полинуклеотидных последовательностей *rg1* в наборе библиотек в базе данных позволил обнаружить высокие уровни экспрессии *rg1* в библиотечках тканей предстательной железы и более низкие уровни в библиотечках других тканей, включая здоровые и опухолевые ткани.

После сборки набора клонов *rg1* в базах данных в непрерывную полинуклеотидную последовательность и редактирования непрерывной последовательности в предсказанном собранном полинуклеотиде была выявлена полноразмерная кодирующая последовательность. Эта последовательность кодировала протеин, гомологичный крысиному миндину.

Для проведения экспериментов были получены Incyte-клоны 1640796, 1712252 и 1880265 фирмы Incyte, и был выявлен клон 3360733, содержащий большую часть 5'-нуклеотидной последовательности. Это клон полностью секвенировали и было установлено, что он содержит полную кодирующую последовательность предсказанного протеина RG1. Эта последовательность представлена на фиг.1 (SEQ ID NO:1).

Полинуклеотиды по изобретению могут иметь форму РНК, например, мРНК, или форму ДНК, включая, например, кДНК и геномную ДНК, полученные путем клонирования или с помощью методов химического синтеза или комбинацией этих методов или с помощью способа, приведенного в настоящем описании. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Одноцепочечная ДНК может включать кодирующую цепь (так же известная как ДНК, включающая смысловую цепь), или она может включать некодирующую цепь, которую также называют антисмысловой цепью.

Последовательность, которая кодирует полипептид, может быть идентична кодирующей последовательности полинуклеотида, представленной фиг.1 (SEQ ID NO:1). Это также может быть полинуклеотид, имеющий другую последовательность, который в результате избыточности (вырожденности) генетического кода кодирует полипептид, представленный на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

Полинуклеотиды по настоящему изобретению, которые кодируют полипептид, представленный на фиг.2 (SEQ ID NO:2), могут включать (но не ограничиваясь ими) последовательность, кодирующую только полипептид; последовательность, кодирующую полипептид, в сочетании с дополнительными некодирующими последовательностями, включая (но не ограничиваясь ими) интроны и некодирующие 5'- и 3'-последовательности, такие как транскрибируемые нетранслируемые последовательности, которые принимают участие в транскрипции, процессинге мРНК (например, сигналы сплайсинга и полиаденилирования), или дополнительные кодирующие последовательности, которые кодируют дополнительные аминокислоты, например, обеспечивающие дополнительные функции. Так, например, полипептид может быть слит с маркерной последовательностью, такой как последовательность пептида, облегчающего очистку слитого полипептида. В определенных предпочтительных вариантах этого объекта изобретения маркерная последовательность среди прочего может представлять собой пептид гексагистидин, такой как tag, находящийся в векторе рTrcHisB (фирма Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния), многие из маркерных последовательностей имеются в продаже. Как описано у Gentz и др. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86: 821-824, 1989) гексагистидин, например обеспечивает удобную очистку слитого протеина.

Полинуклеотиды могут кодировать полипептид, который представляет собой

полипептид, включающий дополнительные аминокислоты, или аминокислоты, расположенные внутри полипептида (когда активная форма состоит, например, более чем из одной полипептидной цепи). Такие последовательности среди прочего могут играть роль в процессинге полипептида из предшественника до конечной
5 формы, могут облегчать миграцию полипептида, могут пролонгировать или сокращать время полужизни полипептида или могут облегчать обработку полипептида для анализа или получения. Как правило, *in situ* дополнительные аминокислоты могут быть отщеплены от полипептида с помощью протеолитических ферментов.

Настоящее изобретение относится также к вариантам описанных выше
10 полинуклеотидов, которые кодируют фрагменты, аналоги и производные полипептида, имеющего выведенную аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2). Вариант полинуклеотида может представлять собой встречающийся в естественных условиях вариант, такой как встречающийся в естественных условиях аллельный вариант, или может представлять собой вариант, который не встречается в
15 естественных условиях. Такие не встречающиеся в естественных условиях варианты полинуклеотида можно получать с помощью методов мутагенеза, включая методы, применимые к полинуклеотидам, клеткам или организмам.

В этой связи варианты могут представлять собой варианты, которые отличаются от вышеописанных полинуклеотидов наличием полинуклеотидных замен, делеций или
20 добавлений. Замены, делеции или добавления могут затрагивать один или несколько полинуклеотидов. В вариантах могут быть сделаны изменения в кодирующей или некодирующей областях или и в тех, и в других областях. Изменения в кодирующих областях включают консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления.

25 В этом плане среди наиболее предпочтительных вариантов следует отметить полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность RG1, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2); их варианты, аналоги, производные и фрагменты и фрагменты вариантов, аналогов и производных.

В этом плане особенно предпочтительными являются полинуклеотиды, кодирующие
30 варианты, аналоги, производные и фрагменты RG1 и варианты, аналоги и производные фрагментов, которые имеют аминокислотную последовательность полипептида RG1, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), в которой в любой комбинации несколько, немного, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 аминокислотный(ые) остаток(тки) заменен(ы), добавлен(ы) или удален(ы), или ни один из аминокислотных остатков не заменен, добавлен или
35 удален. Наиболее предпочтительными в этом плане являются молчащие мутации, добавления или делеции, которые не изменяют свойства и активность полипептида RG1. Также особенно предпочтительными в этом плане являются консервативные замены.

Наиболее предпочтительными являются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID
40 NO:2), которая не содержит замены.

Также предпочтительными вариантами осуществления изобретения являются полинуклеотиды, которые по меньшей мере на 70% идентичны полинуклеотиду, кодирующему полипептид RG1, который имеет аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и полинуклеотиды, комплементарные таким
45 полинуклеотидам. В альтернативном варианте особенно предпочтительными являются полинуклеотиды, которые включают область, по меньшей мере на 80% идентичную полинуклеотиду, кодирующему полипептид RG1, и полинуклеотиды, комплементарные им. Наиболее предпочтительными являются полинуклеотиды, идентичные ему по меньшей мере на 90%, и еще более предпочтительными являются полинуклеотиды, идентичные ему
50 по меньшей мере на 95%. Кроме того, полинуклеотиды, идентичные по меньшей мере на 97%, являются более предпочтительными, чем те, которые идентичны, по меньшей мере на 95%, полинуклеотиды, идентичные по меньшей мере на 98% и по меньшей мере на 99%, являются еще более предпочтительными, а идентичные по меньшей мере на 99%

являются наиболее предпочтительными.

Кроме того, в этом плане наиболее предпочтительными вариантами осуществления являются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, которые сохраняют такую же биологическую активность, что и полипептид, кодируемый полинуклеотидной

5 последовательностью, представленной на фиг.1 (SEQ ID NO:1).

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, которые гибридизуются с вышеописанными последовательностями. В этом плане изобретение прежде всего относится к полинуклеотидам, которые гибридизуются с описанными выше полинуклеотидами в строгих условиях.

10 Как будет дополнительно обсуждено при описании методов анализа полинуклеотидов, указанные выше полинуклеотиды по изобретению можно, например, использовать в качестве зондов для гибридизации кДНК и геномной ДНК с целью выделения полноразмерных кДНК и геномных клонов, кодирующих RG1, и с целью выделения кДНК и геномных клонов других генов, последовательности которых имеют высокую степень

15 аналогии с геномом rg1. Такие зонды, как правило, включают по меньшей мере 15 оснований. Предпочтительно такие зонды имеют по меньшей мере 30 оснований и могут иметь по меньшей мере 50 оснований.

Например, кодирующую область гена rg1 можно выделять путем скрининга библиотек с 20 помощью синтетических олигонуклеотидных зондов, которые созданы с использованием известной последовательности ДНК. Например, для скрининга библиотеки кДНК или геномной ДНК с целью идентификации клонов, гибридизующихся с зондом, можно применять меченый олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную последовательности полинуклеотида по настоящему изобретению.

25 Таким образом, полинуклеотид по настоящему изобретению может кодировать полипептид, полипептид плюс лидерную последовательность (который может быть обозначен как преполипептид).

Подразумевается, что изобретение относится также среди прочего к полинуклеотидам, кодирующим фрагменты полипептидов, полинуклеотидам, гибридизующимся с 30 полинуклеотидами, кодирующими фрагменты полипептидов, прежде всего гибридизующимся в строгих условиях, и к полинуклеотидам, таким как ПЦР-праймеры, для амплификации полинуклеотидов, которые кодируют фрагменты полипептидов. В этом плане предпочтительными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, которые соответствуют описанным ниже предпочтительным фрагментам полипептидов.

35 Полипептиды

Настоящее изобретение относится также к полипептиду RG1, который имеет выведенную аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO: 2).

40 Изобретение относится также к фрагментам, аналогам и производным этих полипептидов. Понятие фрагмент, производное и аналог по отношению к полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2), обозначает полипептид, который в целом сохраняет такую же биологическую активность, что и у полипептида RG1.

Полипептид по изобретению может представлять собой рекомбинантный полипептид, встречающийся в естественных условиях, или синтетический полипептид. В определенных 45 предпочтительных вариантах он представляет собой рекомбинантный полипептид.

Фрагмент, производное или аналог полипептида, представленного на фиг.2 (SEQ ID NO: 2), может представлять собой (I) полипептид, в котором один или несколько аминокислотных остатков заменены консервативными или неконсервативными аминокислотными остатками (предпочтительно консервативным аминокислотным 50 остатком) и такой заменяющий аминокислотный остаток может кодироваться или не кодироваться генетическим кодом, или (II) полипептид, в котором один или несколько аминокислотных остатков включает замещающую группу, или (III) полипептид, слитый с другим соединением, например, с соединением, которое увеличивает время полужизни

полипептида (например, полиэтиленгликоль), или (IV) полипептид, в котором с полипептидом слиты дополнительные аминокислоты, такие как лидерная или секреторная последовательность, или последовательность, применяемая для очистки полипептида. Такие фрагменты, производные и аналоги должны стать очевидны специалистам в данной области после ознакомления с настоящим описанием.

В этом плане среди особенно предпочтительных вариантов осуществления следует отметить полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность RG1, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), их варианты, аналоги, производные и фрагменты и варианты, аналоги и производные фрагментов.

Предпочтительными являются варианты, которые отличаются от эталонной последовательности консервативными аминокислотными заменами. Такие замены представляют собой замену данной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой, которая имеет близкие характеристики. Как правило, в качестве консервативных рассматриваются замены друг на друга алифатических аминокислот Ala, Val, Leu и Ile, взаимозамена несущих гидроксильные группы остатков Ser и Thr, замена друг на друга остатков кислых аминокислот Asp и Glu, замена друг на друга содержащих амидную группу остатков Asn и Gln, замена друг на друга остатков основных аминокислот Lys и Arg и замены остатков ароматических аминокислот Phe и Tyr.

В этом плане также особенно предпочтительными являются варианты, аналоги, производные и фрагменты и варианты, аналоги и производные фрагментов, которые имеют аминокислотную последовательность RG1, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), в которых в любой комбинации несколько, немного, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 аминокислотный(ые) остаток(тки) заменен(ы), добавлен(ы) или удален(ы), или ни один из аминокислотных остатков не заменен, добавлен или удален. Наиболее предпочтительными в этом плане являются молчащие замены, делеции или добавления, которые не изменяют свойства и активность полипептида RG1. Также особенно предпочтительными в этом плане являются консервативные замены. Наиболее предпочтительными являются полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2), которая не содержит замены.

Предпочтительно полипептиды и полинуклеотиды по настоящему изобретению находятся в выделенной форме и особенно предпочтительно очищены до гомогенного состояния.

Полипептиды по настоящему изобретению также включают полипептид, представленный на фиг.2 (SEQ ID NO:2), а также полипептиды, которые по меньшей мере на 70% аналогичны (предпочтительно по меньшей мере на 70% идентичны) полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и более предпочтительно, которые по меньшей мере на 90% аналогичны (предпочтительно по меньшей мере на 90% идентичны) полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO:2), и еще более предпочтительно, которые по меньшей мере на 95% аналогичны (предпочтительно по меньшей мере на 95% идентичны) полипептиду, представленному на фиг.2 (SEQ ID NO: 2), и также включают участки таких полипептидов, причем, такой участок полипептида, как правило, содержит по меньшей мере 30 аминокислот и более предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот.

Как известно в данной области, "степень аналогичности" между двумя полипептидами определяют, сравнивая аминокислотную последовательность и консервативные аминокислотные замены в одном полипептиде с последовательностью второго полипептида.

Фрагменты или участки полипептидов по настоящему изобретению можно применять для получения соответствующих полноразмерных полипептидов с помощью пептидного синтеза; таким образом, фрагменты можно применять в качестве промежуточных продуктов для получения полноразмерных полипептидов.

Фрагменты

Предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения являются

также полипептиды, содержащие фрагменты RG1, наиболее предпочтительно фрагменты RG1, представленного на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

В этом контексте фрагмент представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая полностью совпадает с частью, но не всей аминокислотной последовательностью описанных выше полипептидов RG1 и их вариантов или производных.

Такие фрагменты могут представлять собой "отдельно стоящие" фрагменты, т.е. фрагменты, которые не являются частью или не слиты с другими аминокислотами или полипептидами, или они могут находиться в составе более крупного полипептида, образуя тем самым его область. Если они входят в состав более крупного полипептида, то согласно настоящему изобретению наиболее предпочтительными являются фрагменты, образующие отдельную непрерывную область. Однако некоторые компоненты могут входить в состав одного более крупного полипептида. Например, определенными предпочтительными вариантами осуществления является фрагмент полипептида RG1 по настоящему изобретению, входящий в состав полипептида-предшественника, созданного с целью экспрессии в хозяине и несущего гетерологичные пре- и прополипептидные области, слитые с N-концом RG1-фрагмента, и дополнительную область, слитую с C-концом фрагмента. Таким образом, в частности, под фрагментом в контексте настоящего описания понимают часть или части слитого полипептида или слитого протеина, полученного из RG1.

В качестве репрезентативных примеров фрагментов полипептидов по изобретению можно отметить фрагменты, включающие от примерно 25 до примерно 331 аминокислот.

В этом контексте "примерно" включает конкретно указанный диапазон и диапазоны, которые больше или меньше либо одного из крайних значений, либо обоих крайних значений на несколько, немного, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту. Например, в этом контексте фрагмент длиной примерно 331 аминокислоты обозначает фрагмент полипептида, имеющий длину от 25 аминокислот плюс или минус несколько, небольшое количество, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислота до 331 плюс минус несколько, небольшое количество, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных(ый) остатков(ок), т.е. диапазон включает как от 25 минус несколько аминокислот до 331 плюс несколько аминокислот, так и от 25 плюс несколько аминокислот до 331 минус несколько аминокислот.

В этом плане более предпочтительными являются указанные диапазоны, в которых одно или оба крайних значений отличаются на плюс или минус 5 аминокислот. Еще более предпочтительными являются указанные диапазоны, в которых одно или оба крайних значений отличаются на плюс или минус 3 аминокислоты. Наиболее предпочтительно, когда в указанных диапазонах одно или оба крайних значений отличаются на плюс или минус 1 аминокислоту, либо когда диапазоны строго соответствуют указанным предельным значениям. И самыми предпочтительными являются фрагменты, включающие от примерно 25 до примерно 331 аминокислоты.

Среди наиболее предпочтительных фрагментов по изобретению можно отметить усеченные мутанты RG1. Усеченные мутанты RG1 включают варианты или производные последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2), за исключением делеций непрерывных рядов остатков (т.е. непрерывной области, части или участка), включающих N-конец последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2), или непрерывных рядов остатков, включающих C-конец, или в случае мутантов с двойным усечением - делеций двух непрерывных рядов остатков, один из которых содержит N-конец, а второй содержит C-конец. Фрагменты, имеющие размер, который находится в указанном выше диапазоне, также представляют собой предпочтительные варианты осуществления усеченных фрагментов, которые в целом являются наиболее предпочтительными фрагментами.

Согласно этому объекту изобретения особенно предпочтительными являются фрагменты, отличающиеся наличием биологической и/или иммунологической активности, свойственной RG1. Такие фрагменты включают фрагменты, включающие предсказанные структурные домены RG1, состоящие по меньшей мере из аминокислот в положении от 31

до 103, от 138 до 221 и от 278 до 330, или фрагменты, которые применяют для получения антител, например, описанные в примере 4.

Конкретные предпочтительные в этом плане области приведены на фиг.2 (SEQ ID NO:2) и включают (но не ограничиваясь ими) области указанных выше типов, выявленные с помощью анализа аминокислотной последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2).

Среди наиболее предпочтительных фрагментов по изобретению можно отметить фрагменты, включающие области RG1, объединяющие несколько структурных особенностей, таких как описанные выше особенности. В этом плане наиболее предпочтительными областями являются два домена спондина и один домен тромбоспондина, простирающиеся примерно от аминокислоты в положении 31 до 103, от 138 до 221 и от 278 до 330 соответственно, что характерно для суперсемейства Миндина/спондина протеинов внеклеточного матрикса. Такие области могут включать более крупные полипептиды или могут сами являться предпочтительным фрагментом по настоящему изобретению, как указано выше. В этом разделе понятие "примерно" имеет указанное выше значение и относится к фрагментам в целом.

Также предпочтительными являются области, опосредующие активность RG1. В этом плане наиболее предпочтительными являются фрагменты, которые обладают химической, биологической или другими видами активности RG1, включая фрагменты, обладающие такой же или более высокой активностью или обладающие более низкой нежелательной активностью. Наиболее предпочтительными в этом плане являются фрагменты, которые содержат области, гомологичные по последовательности или находящиеся в таком же положении, или и гомологичные по последовательности и находящиеся в таком же положении, что и активные области родственных полипептидов, например, других протеинов семейства миндина, к которому относится RG1.

Векторы, клетки-хозяева и системы экспрессии

Настоящее изобретение относится также к векторам, которые включают полинуклеотиды по настоящему изобретению, клеткам-хозяевам, которые генетически конструируют с использованием векторов по изобретению, и к получению полипептидов по изобретению с помощью методов рекомбинации. Такие методы описаны у Sambrook и др., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 и у Ausubel F.M. и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Клетки-хозяева можно создавать с помощью методов генетической инженерии с целью включения полинуклеотидов и экспрессии полипептидов по настоящему изобретению. Например, полинуклеотиды можно интродуцировать в клетки-хозяева с помощью хорошо известных методов заражения, трансдукции, трансфекции, трансфекции и трансформации. Полинуклеотиды можно интродуцировать по отдельности или в сочетании с другими полинуклеотидами. Такие дополнительные полинуклеотиды можно интродуцировать независимо, интродуцировать совместно или интродуцировать после связывания с полинуклеотидами по изобретению.

Так, например, полинуклеотидами по изобретению можно трансфектировать клетки-хозяева, например, клетки млекопитающих, совместно с другим отдельным полинуклеотидом, кодирующим селективируемый маркер, с использованием стандартных методов совместной трансфекции (котрансфекции) и селекции. В этом случае полинуклеотиды должны быть стабильно интегрированы в геном клетки-хозяина.

В альтернативном варианте полинуклеотиды можно связывать с вектором, содержащим селективируемый маркер, для размножения в хозяине. Векторную конструкцию можно интродуцировать в клетки-хозяева с помощью вышеуказанных методов. Как правило, плазмидный вектор интродуцируют в клетки-хозяева в виде ДНК в преципитате, таком как преципитат фосфата кальция, или в виде комплекса с заряженным липидом. Для интродукции полинуклеотидов в хозяина также можно использовать электропорацию. Если вектор представляет собой вирус, то его можно упаковывать *in vitro* или

интродуцировать в упаковывающую клетку и упакованный вирус можно трансдуцировать в клетки. Широкое разнообразие методов, которые можно применять для получения полинуклеотидов и для интродукции полинуклеотидов в клетки, являются хорошо известными и стандартными для специалистов в данной области. Такие методы полностью
5 обобщены в процитированном выше справочнике Sambrook с соавторами, в котором проиллюстрированы многие руководства по проведению лабораторных исследований с описанием деталей этих методов. Согласно этому объекту изобретения вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор, одно- или двухцепочечный фаговый вектор, вирусный РНК-овый или ДНК-овый вектор, где РНК или ДНК могут быть одно- или
10 двухцепочечными. Такие векторы можно интродуцировать в клетки в виде полинуклеотидов, предпочтительно ДНК, с помощью хорошо известных методов интродукции ДНК и РНК в клетки. В случае фаговых и вирусных векторов их также можно и предпочтительно интродуцировать в клетки в виде упакованного или капсулированного вируса с использованием хорошо известных методов заражения и трансдукции. Вирусные векторы
15 могут быть репликон-компетентными или репликон-дефицитными. В последнем случае размножение вируса, как правило, происходит только в комплементирующих клетках-хозяевах.

В определенных аспектах предпочтительными являются векторы, предназначенные для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов по настоящему изобретению. Как правило,
20 такие векторы включают действующие в цис-направлении контролирующие области, эффективные для экспрессии в хозяине, функционально связанные с полинуклеотидом, подлежащим экспрессии. Соответствующие действующие в транс-направлении факторы поставляются либо хозяином, либо комплементирующим вектором, либо самим вектором при интродукции в хозяина.

В этой связи конкретными предпочтительными вариантами являются векторы, предназначенные для специфической экспрессии. Такая специфическая экспрессия может представлять собой индуцибельную экспрессию или экспрессию только в определенных типах клеток или как индуцибельную, так и специфичную для определенных клеток экспрессию. Среди индуцибельных векторов наиболее предпочтительными являются
30 векторы, экспрессию которых можно индуцировать с помощью факторов окружающей среды, которыми легко манипулировать, такими как температура или пищевые добавки. Различные векторы по изобретению, включая конститутивные и индуцибельные экспрессионные векторы, которые можно применять в прокариотических и эукариотических хозяевах, являются хорошо известными и соответствуют обычно применяемым
35 специалистами в данной области.

Сконструированные клетки-хозяева можно культивировать в общепринятой питательной среде, которую при необходимости можно модифицировать среди прочего с целью активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов. Условия культивирования, такие как температура, значение рН и т.п., ранее применяемые для
40 клетки-хозяина, отобранного для осуществления экспрессии, как правило, пригодны для экспрессии полипептидов по настоящему изобретению, что должно быть очевидно специалистам в данной области.

Для экспрессии полипептида по изобретению можно использовать широкое разнообразие экспрессионных векторов. Такие векторы включают хромосомные,
45 эписомные и происходящие из вируса векторы, например, векторы, происходящие из бактериальных плазмид, из бактериофагов, из эписом дрожжей, из элементов хромосом дрожжей, из вирусов, таких как бакуловирус, паповавирус, такой как SV40, вирус коровьей оспы, аденовирус, вирус оспы домашней птицы, вирус псевдобешенства, ретровирус и альфавирус, такой как Синдбис-вирус, и векторы, полученные путем их
50 комбинаций, такие как полученные из генетических элементов плазмиды и бактериофага, например, космиды и фагмиды, причем согласно данному объекту изобретения все эти вирусы можно применять для экспрессии. Как правило, для экспрессии можно применять любой вектор, пригодный для поддержания, размножения или экспрессии полинуклеотидов

с целью экспрессии полипептида в хозяине.

Соответствующую последовательность ДНК можно встраивать в вектор с помощью любой из широкого разнообразия известных и стандартных методик. В целом, последовательность ДНК, предназначенную для экспрессии, связывают с экспрессионным вектором путем расщепления последовательности ДНК и экспрессионного вектора с помощью одной или нескольких рестриктаз, и последующего объединения рестрикционных фрагментов с помощью ДНК-лигазы фага T4. Методы рестрикции и связывания путем лигирования, которые можно использовать для этой цели, хорошо известны и являются стандартными для специалистов в данной области. Альтернативные методики рестрикции и связывания путем лигирования, а также конструирования экспрессионных векторов, которые также хорошо известны и являются стандартными для специалистов в данной области, изложены более подробно в процитированном выше руководстве Sambrook с соавторами.

Последовательность ДНК в экспрессионном векторе функционально связывают с соответствующими(ей) контролирующими(ей) экспрессию последовательностями(тью), включая, например, промотор для направления транскрипции мРНК. Лишь некоторыми репрезентативными примерами таких хорошо известных промоторов являются промотор РL фага лямбда, промоторы lac, trp, tac и trc E.coli, ранние и поздние промоторы SV40 и промоторы ретровирусных LTR (длинные повторы РНК на концах генома). Следует понимать, что согласно этому объекту изобретения можно применять многочисленные не упомянутые промоторы, которые хорошо известны и которые специалисты в данной области могут легко использовать таким же образом, который проиллюстрирован и обсужден ниже в примерах.

В целом, конструкции для экспрессии должны содержать сайты для инициации и терминации транскрипции и в транскрибируемой области - необходимый для трансляции сайт связывания рибосом. Кодированная область транскриптов, экспрессируемых с помощью конструкций, должна включать сайт инициации AUG в начале и соответствующим образом расположенный терминирующий кодон на конце полипептида, подлежащего трансляции.

Кроме того, конструкции могут содержать контролирующие области, которые регулируют, а также иницируют экспрессию. Как правило, согласно многочисленным обычно применяемым методикам, такие области, в частности, сайты связывания репрессора и энхансеры, могут контролировать транскрипцию.

Векторы для размножения и экспрессии, как правило, должны включать селектируемые маркеры. Такие маркеры также можно применять для амплификации, или векторы могут содержать дополнительные маркеры для этой цели. В этой связи экспрессионные векторы предпочтительно содержат один или нескольких селектируемых маркерных генов для обеспечения проявления фенотипического признака с целью отбора трансформированных клеток-хозяев. Предпочтительные маркеры включают гены, обуславливающие устойчивость к дигидрофолатредуктазе, неомицину, пурамицину или гигромицину для культуры эукариотических клеток, и гены, обуславливающие устойчивость к тетрациклину, теомицину, канамицину или ампициллину, для культуры E.coli и других бактерий.

Вектор, содержащий соответствующую последовательность ДНК, описанную выше, а также соответствующий промотор и другие соответствующие контролирующие последовательности, можно интродуцировать в соответствующего хозяина с помощью различных хорошо известных методик, пригодных для экспрессии в нем требуемого полипептида. Репрезентативные примеры соответствующих хозяев включают бактериальные клетки, такие как клетки E.coli, Streptomyces и Salmonella typhimurium; грибные клетки, такие как клетки дрожжей; клетки насекомых, такие как клетки линии S2 Drosophila и линии Sf9 Spodoptera; клетки животных, такие как клетки CHO, COS и меланомы Бовеса; и растительные клетки, предпочтительно клетки насекомых линии VT1-TN-5B1-4. Хозяева, в которых можно осуществлять экспрессию широкого разнообразия конструкций, хорошо известны, и специалисты в данной области, исходя из настоящего описания, легко могут выбрать хозяина для экспрессии полипептидов по изобретению.

Для экспрессии также можно применять различные системы культур клеток млекопитающих. Примеры систем экспрессии млекопитающих включают линии COS-7 фибробласта почки обезьяны (Gluzman и др., Cell, 23: 175, 1991). Другие линии клеток, в которых может происходить экспрессия совместимого вектора, включают, например, 5 линии клеток C127, 3T3, CHO, HeLa, линию клеток почки человека 293 и линию ВНК. В клетках млекопитающих-хозяевах можно применять многочисленные основанные на вирусах экспрессионные системы. В случае, когда в качестве экспрессионного вектора используется аденовирус, полинуклеотид, кодирующий полипептид RG1, можно встраивать 10 путем лигирования в комплекс транскрипции/трансляции аденовируса, включающий поздний промотор и состоящую из трех частей лидерную последовательность. Встраивание в не имеющую решающего значения область E1 или E3 вирусного генома должно привести к получению жизнеспособного вируса, обладающего способностью экспрессировать RG1 в зараженных клетках-хозяевах (Logan и Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3655-3659, 1984). Кроме того, энхансеры транскрипции, такие как 15 энхансер вируса саркомы Рауса (RSV), можно применять для усиления экспрессии в клетках млекопитающих-хозяевах.

Более конкретно, настоящее изобретение включает также рекомбинантные конструкции, такие как конструкции для экспрессии, включающие одну или несколько описанных выше 20 последовательностей. Конструкции включают вектор, такой как плазмидный или вирусный вектор, в который должна быть встроена конструкция по изобретению. Последовательность можно встраивать в прямой или обратной ориентации. В определенных предпочтительных вариантах конструкция дополнительно включает регуляторные последовательности, в том числе, например, промотор, функционально связанный с последовательностью. Специалистам в данной области известно большое количество приемлемых векторов и 25 промоторов и многие имеющиеся в продаже векторы можно применять согласно настоящему изобретению.

Следующие векторы, которые имеются в продаже, приведены в качестве примера. Среди векторов предпочтительными для применения в бактериях являются pQE70, pQE60 и pQE-9, поставляемые фирмой Qiagen США (Валенсия, штат Калифорния); векторы pBS, 30 векторы Phagescript®, векторы Bluescript®, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, поставляемые фирмой Stratagene (Ла Жолла, штат Калифорния); и ptrc99, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, поставляемые фирмой Pharmacia Biotech (Пискатавей, штат Нью-Джерси). Наиболее предпочтительным является вектор pTrcHisB, поставляемый фирмой Invitrogen. Предпочтительными эукариотическими векторами являются pWLNEO, 35 pSV2CAT, pOG44, PXT1 и pSG, поставляемые фирмой Stratagene; и PSVK3, pBPV, pMSG и pSVI, поставляемые фирмой Pharmacia Biotech. Наиболее предпочтительным является вектор pCIneo, поставляемый фирмой Promega. Эти векторы перечислены только в качестве иллюстрации целого ряда имеющихся в продаже и хорошо известных векторов, которые могут применяться специалистами в данной области согласно этому объекту 40 изобретения. Ясно, что любые другие плазмиды или векторы, пригодные, например, для интродукции, поддержания, размножения или экспрессии полинуклеотида или полипептида по изобретению в хозяине, можно применять согласно этому объекту изобретения.

Промоторные области можно выбирать из любого требуемого гена, используя векторы, которые содержат репортерную транскрипционную единицу, лишённую промоторной 45 области, такую как транскрипционная единица хлорамфениколацетилтрансферазы ("cat"), расположенную по ходу транскрипции сайта или сайтов рестрикции, для интродукции промоторного фрагмента-кандидата, т.е. фрагмента, который может содержать промотор. Как хорошо известно, интродукция в вектор содержащего промотор фрагмента в сайт рестрикции, расположенный против хода транскрипции относительно гена cat, усиливает 50 производство CAT-активности, что можно обнаружить с помощью стандартных анализов CAT. Векторы, пригодные для этой цели, хорошо известны и легко доступны. В качестве примера двух таких векторов можно отметить pKK232-B и pCM7. Таким образом, для экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению можно применять не только

хорошо известные и легко доступные промоторы, но также и промоторы, которые легко могут быть получены с помощью вышеизложенного метода с использованием репортерного гена.

Из известных бактериальных промоторов, пригодных для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов согласно настоящему изобретению, следует отметить промоторы *lacI* и *lacZ* *E.coli*, промоторы фагов T3 и T7, промотор *tac* фага T5, промоторы PR, PI фага лямбда, промотор *trp* и гибридный промотор *trc*, полученный из промоторов *trp* и *lac*. Из известных эукариотических промоторов пригодными в этом плане являются непосредственный ранний промотор CMV, промотор тимидинкиназы HSV, ранний и поздний промоторы SV40, промоторы ретровирусных LTR, такие как промоторы вируса саркомы Рауса ("RSV"), и промоторы металлотионеина, такой как мышинный промотор металлотионеина-1.

Выбор соответствующих векторов и промоторов для экспрессии в клетке-хозяине является хорошо известной процедурой и требования к методикам конструирования экспрессионных векторов, интродукции вектора в хозяина и экспрессии в хозяине являются стандартными для специалистов в данной области.

Как правило, рекомбинантные экспрессионные векторы должны включать сайты инициации репликации, промотор, полученный из гена с высоким уровнем экспрессии, для осуществления транскрипции по ходу транскрипции структурной последовательности и селективируемый маркер для осуществления выделения содержащих вектор клеток после обработки вектором.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим вышеуказанные конструкции, которые описаны выше. Клетка-хозяин может представлять собой клетку высшего эукариотического организма, такую как клетка млекопитающего, или клетку низшего эукариотического организма, такую как клетка дрожжей, или клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, такую как бактериальная клетка. В клетках-хозяевах можно применять общепринятым образом конструкции, предназначенные для получения генного продукта, кодируемого рекомбинантной последовательностью.

Полипептиды можно экспрессировать в клетках млекопитающих, дрожжей, бактерий или в других клетках под контролем соответствующих промоторов. Для получения таких протеинов также можно применять бесклеточные системы трансляции с использованием РНК, полученных из конструкций ДНК по настоящему изобретению.

Соответствующие клонирующие и экспрессионные векторы, которые можно применять в сочетании с прокариотическими и эукариотическими хозяевами, описаны в процитированном ранее руководстве Sambrook с соавторами.

Транскрипцию ДНК, кодирующей полипептиды по настоящему изобретению, в высших эукариотах можно усиливать путем встраивания в вектор энхансерной последовательности. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, как правило длиной 10-300 пар оснований, действие которых заключается в повышении транскрипционной активности промотора в данном типе клетки-хозяина. Примеры энхансеров включают энхансер SV40, который локализован на конце сайта инициации транскрипции в области от 100 до 270 пар оснований, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на конце сайта инициации транскрипции и энхансеры аденовирусов.

Полинуклеотиды по изобретению, кодирующие гетерологичную структурную последовательность полипептида по изобретению, как правило, должны быть встроены в вектор с помощью стандартных методик так, чтобы для обеспечения их экспрессии они были функционально связаны с промотором. Полинуклеотиды должны быть расположены так, чтобы сайт начала транскрипции был локализован в направлении 5'-конца относительно сайта связывания рибосом. Сайт связывания рибосом должен быть расположен на 5'-конце относительно AUG, иницирующего трансляцию полипептида, подлежащего экспрессии. Как правило, не должны присутствовать никакие другие открытые

рамки считывания, которые начинались бы на иницирующем кодоне, обычно AUG, и находились бы между сайтом связывания рибосом и иницирующим кодоном AUG. Также, как правило, на конце полипептида должен присутствовать стоп-кодон трансляции и должны присутствовать сигнал полиаденилирования и сигнал терминации транскрипции, расположенные в направлении 3'-конца транскрибируемой области.

Для секреции протеина после его трансляции в полость эндоплазматического ретикулаума, в периплазматическое пространство или во внеклеточное окружение в экспрессируемый полипептид могут быть включены соответствующие сигналы секреции. Сигналы могут быть эндогенными по отношению к полипептиду, или они могут

представлять собой гетерологичные сигналы. Полипептид можно экспрессировать в модифицированной форме, такой как слитый протеин, и он может включать не только сигналы секреции, но также и дополнительные гетерологичные функционально активные области. Так, например, к N-концу полипептида можно добавлять область дополнительных аминокислот, в частности заряженных аминокислот, для улучшения стабильности и персистентности в клетке-хозяине в процессе очистки или в процессе последующей обработки и хранения. Кроме того, к полипептиду также можно добавлять специальные области с целью облегчения очистки. Такие области могут быть удалены до конечной стадии получения полипептида. Добавление к полипептидам пептидных фрагментов среди прочего с целью усиления секреции или экскреции, с целью улучшения стабильности и облегчения очистки является известным и его осуществляют с помощью общепринятых методик в данной области. Например, когда для индукции антител необходимы большие количества RG1, могут требоваться векторы, которые обеспечивают высокий уровень экспрессии слитых протеинов, легко поддающихся очистке. Такие векторы включают (но не ограничиваясь ими) многофункциональные клонирующие и экспрессионные векторы *E. coli*, такие как Bluescript® (фирма Stratagen), в которые кодирующая последовательность rg1 может быть встроена путем лигирования в вектор в рамку считывания N-концевого Met и субпоследовательности 7 остатков β-галактозидазы так, что продуцируется гибридный протеин; вектор pIN (Van Heede и Shuster, *J. Biol. Chem.*, 264: 5503-5509, 1989) и т.п. Векторы pTrcHis (фирма Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния) можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых протеинов, содержащих полигистидиновую метку (6xHis) для быстрой очистки. Протеины, полученные в таких системах, конструируют так, чтобы они включали сайты расщепления, такие как сайт расщепления энтерокиназой, в результате чего в случае необходимости представляющий интерес клонированный полипептид может высвободиться из слитого пептидного фрагмента.

После трансформации приемлемой линии хозяина и выращивания линии хозяина до требуемой плотности клеток индуцибельные промоторы, если они присутствуют, можно индуцировать соответствующими стимулами (например, сдвигом температуры или обработкой химическим индуцирующим агентом) и культивировать клетки в течение дополнительного периода времени.

Затем, как правило, клетки собирают центрифугированием, разрушают физическим или химическим путем и образовавшийся неочищенный экстракт хранят для дальнейшей очистки.

Применяемые для экспрессии протеина клетки микроорганизмов можно разрушать любым общепринятым методом, в том числе с использованием циклов замораживания-оттаивания, облучения ультразвуком, механического разрушения или с помощью лизирующих клеток агентов, эти методы хорошо известны специалистам в данной области.

Полипептид RG1 можно выделять и очищать от культур рекомбинантных клеток с помощью хорошо известных методов, таких как осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстракция кислотой, анион- или катионообменная хроматография, хроматография на фосфоцеллюлозе, хроматография, основанная на гидрофобном взаимодействии, аффинная хроматография, хроматография на гидроксилпатите и хроматография на лецитине. Наиболее предпочтительно для очистки использовать

жидкостную хроматографию высокого разрешения ("ЖХВР"). Для возобновления складчатости протеина с целью восстановления активной конформации в случае, когда протеин был денатурирован в процессе выделения и/или очистки, можно применять хорошо известные методы. Различные другие методы очистки протеинов, хорошо известные в данной области, включают методы, описанные у Deutscher M., в: *Methods in Enzymology*, том 182, Academic Press, San Diego, 1982; и у Scorpas R. в: *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982.

В альтернативном варианте полипептиды по настоящему изобретению можно получать путем прямого пептидного синтеза с использованием методик твердофазного синтеза (Stewart и др., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield J., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154, 1963). Синтез протеинов *in vitro* можно осуществлять вручную или автоматически. Автоматический синтез можно проводить, например, с использованием пептидного синтезатора типа Applied Biosystems 431 A (фирма Perkin Elmer, Фостер Сити, штат Калифорния) согласно инструкциям производителя. Различные фрагменты RG1 можно синтезировать химическим путем по отдельности и объединять с помощью химических методов с получением полноразмерной молекулы.

Полипептиды по настоящему изобретению включают встречающиеся в естественных условиях очищенные продукты, продукты, полученные химическим синтезом, и продукты, полученные с помощью методов рекомбинации с использованием прокариотических или эукариотических хозяев, таких, например, как клетки бактерий, дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого для получения полипептидов рекомбинантным путем, полипептиды по настоящему изобретению могут быть гликозилированы или не гликозилированы. Кроме того, полипептиды по изобретению могут также включать предварительно модифицированный остаток метионина, что в некоторых случаях является результатом связанных с хозяином процессов.

Применение полипептидов RG1 и кодирующих их полинуклеотидов

Согласно изобретению полинуклеотиды rg1 и полипептиды RG1 можно использовать для различных целей, в частности на основе химических и биологических свойств RG1. Дополнительные пути применения связаны с диагностикой и лечением нарушений клеточной пролиферации, таких как рак предстательной железы. Эти объекты изобретения дополнительно проиллюстрированы и обсуждены ниже и приведены в описании.

Возможность применения полинуклеотидных и полипептидных последовательностей по настоящему изобретению частично обусловлена химической и структурной гомологией между RG1 по изобретению и другими молекулами внеклеточного матрикса и предпочтительной экспрессией RG1 в тканях предстательной железы по сравнению с другими тканями. RG1 можно применять для диагностики и лечения состояний, нарушений или заболеваний, связанных с аномальным ростом ткани предстательной железы. Они включают (но не ограничиваясь ими) рак и метастатический рост опухоли.

Полинуклеотидные последовательности rg1 можно применять в качестве ДНК-зондов и в качестве мишеней для антисмысловой и рибозимной терапии или в качестве матриц для получения антисмысловых полинуклеотидов.

Полипептиды RG1 можно применять для выработки антител к RG1, которые можно использовать для обнаружения уровней полипептида RG1 в клетках и тканях, и для направленного переноса лекарственных средств к первичным и метастатическим опухолям.

Полипептиды RG1 можно применять для стимуляции иммунного ответа на содержащие RG1 клетки.

Полинуклеотиды, кодирующие RG1, можно использовать для диагностических анализов с целью обнаружения уровней кодирующих RG1 полинуклеотидов в клетках и тканях.

При состояниях, связанных с экспрессией RG1, таких как рак предстательной железы, можно оказаться целесообразным подавлять экспрессию или активность RG1. Экспрессию

RG1 можно подавлять введением антисмысловых олигонуклеотидов или рибозимов. В другом варианте для лечения болезней или состояний, связанных с активностью RG1, можно применять антитела, специфически распознающие области полипептида RG1, которые ответственны за его активность.

5 Анализ полинуклеотидов

Настоящее изобретение относится также к применению связанных с rg1 полинуклеотидов для выявления комплементарных полинуклеотидов, например, в качестве диагностического реагента. Выявление полинуклеотидов rg1, связанных с болезненным состоянием, может представлять собой инструмент для развития методов диагностики *in vitro* и *in vivo* диагностики, которые могут способствовать дополнению или уточнению диагноза или выявления наличия чувствительности к заболеванию, являющемуся результатом тканеспецифичной экспрессии RG1.

10 С помощью различных методик на уровне ДНК можно обнаружить индивидуумов, которые несут мутации в гене, кодирующем RG1. Образцы полинуклеотидов для диагностики можно получать из клеток пациента, например, из крови, мочи, слюны, материала, полученного с помощью биопсии и аутопсии ткани. Для анализа геномную ДНК можно использовать непосредственно или после предварительной ферментативной амплификации с помощью ПЦР (Saiki и др., Nature, 324: 163-166, 1986). Аналогичным образом можно применять РНК или кДНК. Например, ПЦР-праймеры, комплементарные полинуклеотидной последовательности, кодирующей RG1, можно применять для идентификации и анализа экспрессии и мутаций rg1. Например, делеции и инсерции можно обнаружить по изменению размера амплифицированного продукта по сравнению с нормальным генотипом. Точковые мутации можно идентифицировать с помощью гибридизации амплифицированной ДНК с радиоактивно меченной РНК rg1 или в другом варианте с помощью радиоактивно меченных антисмысловых последовательностей ДНК. Точно совпадающие последовательности можно отличать от ошибочно спарившихся дуплексов на основе расщепления РНКазой А или по различиям в температурах плавления.

Различия между последовательностями эталонных генов и генов, имеющих мутации, также могут быть обнаружены путем непосредственного секвенирования ДНК. Кроме того, клонированные сегменты ДНК можно применять в качестве зондов для обнаружения специфических сегментов ДНК. Чувствительность таких методов можно существенно увеличить путем соответствующего применения ПЦР или другого метода амплификации. Например, праймеры для секвенирования применяют в сочетании с двухцепочечным ПЦР-продуктом или одноцепочечной молекулой матрицы, полученной с помощью модифицированной ПЦР. Определение последовательности осуществляют с помощью общепринятых методик с использованием радиоактивно меченного полинуклеотида или путем процедур автоматического секвенирования с использованием флуоресцентных меток.

40 Генетическое тестирование, основанное на различиях в последовательности ДНК, можно осуществлять путем выявления изменения в электрофоретической подвижности фрагментов ДНК в гелях с добавлением денатурирующих агентов или без них. Небольшие делеции и инсерции в последовательности можно визуализировать с помощью гель-электрофореза высокого разрешения. Различия между фрагментами ДНК различных последовательностей можно выявлять с использованием денатурирующих гелей в градиенте формамида, на которых подвижность различных фрагментов ДНК замедляется в геле в различных положениях в зависимости от их специфической температуры плавления или частичной температуры плавления (см., например, Myers и др., Science, 230: 1242, 1985).

50 Замены в определенных областях последовательности можно выявлять с помощью анализов на основе защиты нуклеазы, таких как защита от действия РНКазы и S1, или методом химического расщепления (см., например, Caton и др., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4397-4401, 1985).

Так, обнаружение специфической последовательности ДНК можно осуществлять с помощью таких методов, как гибридизация, защита РНКазы, химическое расщепление, непосредственное секвенирование ДНК или с помощью рестриктаз (например, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ("ПДРФ") и Саузерн-блоттинг геномной ДНК).

Помимо использования наиболее распространенных методов гель-электрофореза и секвенирования ДНК мутации также можно выявлять путем анализов *in situ*.

Анализ полипептидов

Настоящее изобретение относится также к диагностическим анализам, таким как количественные и диагностические анализы для выявления уровней полипептида RG1 в клетках и тканях и общей воде организма, включая определение нормальных и аномальных уровней. Так, например, диагностический анализ по изобретению для обнаружения сверхэкспрессии полипептида RG1 по сравнению с образцами нормальной контрольной ткани можно применять для обнаружения присутствия неоплазии, например, рака предстательной железы. Такие диагностические тесты можно также применять для обнаружения метастатического роста опухоли. Методы анализов, которые можно использовать для определения уровней полипептида, такого как полипептид RG1 по настоящему изобретению, в образце, взятом из организма хозяина, хорошо известны специалистам в данной области. Такие методы анализов включают радиоиммуноанализ (РИА), анализы конкурентного связывания, Вестерн-блоттинг и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), а также анализ с использованием клеточного сортера с возбуждением флуоресценции (FACS). Из этих методов часто предпочтительным является ELISA. Метод ELISA включает первоначальное получение антитела, специфического по отношению к RG1, предпочтительно моноклонального антитела. Кроме того, как правило получают репортерное антитело, которое обладает способностью к связыванию с моноклональным антителом. Репортерное антитело связывают с обнаруживаемым реагентом, таким как радиоактивный, флуоресцентный реагент или фермент, например, пероксидаза из хрена.

Для осуществления ELISA образец выделяют из хозяина и инкубируют на твердой подложке, например, полистироловом планшете, которая связывает полипептиды образца. Все свободные сайты связывания на планшете затем сенсibiliзируют (покрывают) путем инкубации с неспецифическим протеином, таким как бычий сывороточный альбумин. Затем моноклональное антитело инкубируют на планшете, в это время моноклональные антитела связываются со всеми полипептидами RG1, которые связаны с полистироловым планшетом. Несвязанное моноклональное антитело отмывают буфером. Репортерное антитело, связанное с пероксидазой из хрена, помещают в планшет, что приводит к связыванию репортерного антитела со всеми моноклональными антителами, связанными с RG1. Неприсоединенное репортерное антитело затем отмывают. Затем в планшет вносят реагенты для определения пероксидазной активности, включая колориметрический субстрат. Имобилизованная пероксидаза, связанная с RG1 через первичные и вторичные антитела, образует окрашенный продукт реакции. Количество образовавшегося окрашенного продукта в определенный период времени свидетельствует о количестве полипептида RG1, присутствующего в образце. Количественные данные, как правило, получают путем сравнения со стандартной кривой.

Можно применять конкурентный анализ, согласно которому антитела, специфические по отношению к RG1, связывают с твердой подложкой и меченый RG1 и образец, полученный из хозяина, наносят на твердую подложку, при этом количество обнаруженной метки, присоединенной к твердой подложке, может коррелировать с количеством RG1 в образце.

Эти и другие анализы описаны среди прочего у Hampton и др. (*Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn, 1990) и у Maddox и др. (*J. Exp. Med.*, 158: 12111, 1983).

Антитела

Изобретение относится также к антителам, которые специфически связываются с RG1,

которые в контексте настоящего описания называют антитела к RG1. Такие характеристики, как сверхэкспрессия RG1 в тканях предстательной железы и его локализация на клеточной поверхности, являются прекрасным маркером для скрининга, диагностики, прогноза, последующих анализов и визуализации. Кроме того, эти

5 характеристики свидетельствуют о том, что RG1 может представлять собой очень хорошую мишень для терапевтических методов, таких как направленная терапия с использованием антител, иммунотерапия и генная терапия. В контексте настоящего описания понятие "специфически связывается с" обозначает взаимодействие антитела и полипептида, причем взаимодействие зависит от присутствия определенной структуры (т.е. антигенной

10 детерминанты или эпитопа) на полипептиде; другими словами, антитело распознает и связывается со специфической структурой полипептида, а не с протеинами в целом.

Полипептиды RG1, их фрагменты или другие производные или их аналоги, или клетки, экспрессирующие их, можно использовать в качестве иммуногена для получения антител к ним (Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1989). Эти антитела могут,

15 например, представлять собой поликлональные или моноклональные антитела. Настоящее изобретение включает также химерные, одноцепочечные, гуманизированные и человеческие антитела, а также их Fab-фрагменты или продукты экспрессионной библиотеки Fab. Различные известные в данной области методики можно применять для получения таких антител и фрагментов.

20 Антитела к полипептидам, соответствующим последовательности по настоящему изобретению, можно получать путем непосредственной инъекции полипептидов в животное или путем введения полипептидов животному, предпочтительно кроме человека. Полученное таким образом антитело затем должно связываться с самими полипептидами. При таком методе даже последовательность, кодирующую только фрагмент полипептидов,

25 можно применять для получения антител, связывающихся с полноразмерными нативными полипептидами. Такие антитела затем можно применять для выделения полипептида из ткани, в которой происходит экспрессия полипептида.

Для получения моноклональных антител можно применять любые методики, обеспечивающие выработку антител непрерывными культурами линий клеток. Примеры

30 включают метод, основанный на использовании гибридом (Kohler и Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975), метод, основанный на использовании человеческих В-клеточных гибридом (Kozbor и др., *Immunology Today*, 4: 72, 1983), и метод, основанный на применении EBV-гибридом, для получения человеческих моноклональных антител (Cole и др., в: *Monoclonal Antibodies and Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985).

35 Кроме того, можно применять методики, предназначенные для получения "химерных антител", сплайсинга генов мышинных антител с генами человеческих антител с получением молекулы с соответствующей антигенной специфичностью и биологической активностью (Morrison и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855, 1984; Neuberger и др., *Nature*, 312: 604-608, 1984; Takeda и др., *Nature*, 314: 452-454, 1985). В

40 альтернативном варианте методики, описанные для получения одноцепочечных антител (патент США 4946778), можно адаптировать для производства RG1-специфических одноцепочечных антител.

Кроме того, "человеческие" антитела можно получать с помощью методов, описанных в патентах США 5877397 и 5569825, которые полностью включены в настоящее описание в

45 качестве ссылки.

Антитела можно также получать, индуцируя производство *in vivo* в популяции лимфоцитов, или путем скрининга библиотек или панелей рекомбинантных иммуноглобулинов с использованием реагентов с высокой специфичностью связывания согласно методу, описанному у Orlandi и др. (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 3833-3837, 1989) и у Winter и Milstein (*Nature*, 349: 293-299, 1991).

50

Также можно получать фрагменты антител, которые содержат специфические связывающие RG1 сайты. Например, такие фрагменты включают (но не ограничиваясь ими) P(ab')₂-фрагменты, которые можно получать расщеплением пепсином молекулы

антитела, и Fab-фрагменты, которые можно получать восстановлением дисульфидных мостиков P(ab')₂-фрагментов. В альтернативном варианте можно конструировать экспрессионные библиотеки Fab, которые позволяют быстро и легко идентифицировать моноклональные Fab-фрагменты, обладающие требуемой специфичностью (Huse и др.,
5 Science, 256: 1270-1281, 1989).

Аминокислотную последовательность RG1, представленную в настоящем описании, можно применять для выбора специфических областей полипептида RG1 с целью получения антител. Как должно быть очевидно специалистам, области или эпитопы полипептида RG1, к которым направлено антитело, могут варьироваться в зависимости от
10 предполагаемого применения. Например, антитела, предназначенные для применения в иммуноанализе для обнаружения связанного с мембраной RG1 на поверхности клеток предстательной железы, должны связываться с доступными эпитопами на полипептиде RG1. Области полипептида RG1, имеющие иммуногенную структуру, а также другие области и домены легко можно идентифицировать с помощью различных других методов,
15 известных в данной области, таких как анализы Chou-Fasman, Garnier-Robson или Jameson-Wolf. Фрагменты, содержащие эти остатки, наиболее пригодны для получения антител к RG1. Особенно ценные в этом плане фрагменты включают (но не ограничиваясь ими) последовательность PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO:8); HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO:10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO:11) и NEIVDSASVPET (SEQ ID NO:
20 12). Получение поликлональных антител к этим областям описано в примере 4.

Антитела к RG1 по изобретению могут быть особенно ценными для диагностических анализов, методов визуализации и терапевтических методов, направленных на регулирование рака предстательной железы. Изобретение относится к различным иммунологическим анализам, которые можно применять для обнаружения полипептидов
25 RG1 и для диагностики рака предстательной железы. Для таких анализов, как правило, применяют одно или несколько антител к RG1, обладающих способностью распознавать и связываться с полипептидом RG1. Наиболее предпочтительные антитела должны избирательно связываться с RG1 и не должны связываться (или слабо связываться) с полипептидами, не относящимися к RG1. Анализы включают различные форматы
30 иммунологических анализов, которые хорошо известны в данной области, включая (но не ограничиваясь ими) различные типы радиоиммуноанализов, твердофазные иммуноферментные анализы и т.п. Кроме того, изобретение также относится к методам иммунологической визуализации, с помощью которых можно обнаружить рак предстательной железы, включая (но не ограничиваясь ими) методы
35 радиосцинтиграфической визуализации, основанные на использовании меченых антител к RG1. Такие анализы могут применяться в клинических условиях для обнаружения, мониторинга и прогноза рака предстательной железы.

Описанные выше антитела можно применять для выделения или идентификации клонов, экспрессирующих полипептид, или для очистки полипептида по настоящему
40 изобретению путем прикрепления антитела к твердой подложке для выделения и/или очистки с помощью аффинной хроматографии.

Кроме того, антитела к RG1 можно применять для выделения RG1-позитивных клеток с помощью методов сортировки и очистки клеток. В частности, антитела к RG1 можно применять для выделения клеток рака предстательной железы из ксенотрансплантатов
45 опухолевой ткани, из клеток в культуре и т.д. с использованием основанных на применении антител методов сортировки или очистки клеток с помощью аффинной хроматографии. Другие варианты применения антител к RG1 по изобретению включают получение антиидиотипических антител, имитирующих полипептид RG1.

Антитела к RG1 можно применять для обнаружения присутствия рака предстательной
50 железы или метастазов опухоли. Присутствие таких содержащих RG1 клеток в различных биологических образцах, включая сыворотку, полученные с помощью биопсии образцы предстательной железы или других тканей, можно выявлять с помощью антител к RG1. Кроме того, антитела к RG1 можно применять для различных методов визуализации, таких

как иммуноскинтиграфия с использованием Tc-99m (или другого изотопа), конъюгированного с антителом. Например, для обнаружения рекуррентных и метастатических карцином предстательной железы можно использовать протокол визуализации, аналогичный недавно описанному, который основан на применении In-111, конъюгированного с антителом к специфическому для предстательной железы мембранному антигену (PSMA) (Sodee и др., Clin. Nuc. Med., 21: 759-766, 1997).

Антитела к RG1 по изобретению можно метить с помощью обнаруживаемого маркера или их можно конъюгировать с второй молекулой, такой как цитотоксический агент, и применять для направленного переноса второй молекулы в RG1-позитивные клетки (Vitetta E.S. и др., в: Immunotoxin Therapy, ред. DeVita Jr. V.T. и др., Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4-ое изд., J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993). Примеры цитотоксических агентов включают (но не ограничиваясь ими) ризин, доксорубин, даунорубин, таксол, бромид этидия, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, дигидроксиантрацинон, актиномицин D, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин и глюкокортикоид, и другие химиотерапевтические агенты, а также радиоактивные изотопы. Приемлемые обнаруживаемые маркеры включают (но не ограничиваясь ими) радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, биолюминесцентное соединение, хемилюминесцентное соединение, металлический хелатор или фермент. Приемлемые радиоактивные изотопы включают следующие: сурьма-124, сурьма-125, мышьяк-74, барий-103, барий-140, бериллий-7, висмут-206, висмут-207, кадмий-109, кадмий-115m, кальций-45, церий-139, церий-141, церий-144, цезий-137, хром-51, кобальт-56, кобальт-57, кобальт-58, кобальт-60, кобальт-64, эрбий-169, европий-152, гадолиний-153, золото-195, золото-199, гафний-175, гафний-181, индий-11, йод-123, йод-131, иридий-192, железо-55, железо-59, криптон-85, свинец-210, марганец-54, ртуть-197, ртуть-203, молибден-99, неодим-147, нептуний-237, никель-63, ниобий-95, осмий-185+191, палладий-103, платина-195m, празеодим-143, прометий-147, протактиний-233, радий-226, рений-186, рубидий-86, рутений-103, рутений-106, скандий-44, скандий-46, селен-75, серебро-110m, серебро-111, натрий-22, стронций-85, стронций-89, стронций-90, сера-35, тантал-185, технеций-99m, теллур-125, теллур-132, таллий-170, таллий-204, торий-228, торий-232, олово-113, титан-44, вольфрам-185, ванадий-48, ванадий-49, иттербий-169, иттрий-88, иттрий-90, иттрий-91, цинк-65 и цирконий-95.

Иммунотерапия рака предстательной железы

Изобретение относится к различным иммунотерапевтическим методам, предназначенным для лечения рака предстательной железы, включая терапию с использованием антител, вакцинацию *in vivo* и иммунотерапевтические подходы для лечения *ex vivo*. Согласно одному из вариантов изобретение относится к антителам к RG1, которые можно применять системно для лечения рака предстательной железы. Например неконъюгированные антитела к RG1 можно вводить пациенту таким образом, что антитело связывается с RG1 на поверхности, внутри опухолевых клеток предстательной железы или ассоциируется с этими клетками и опосредует разрушение клеток и опухоли с помощью механизмов, которые могут включать опосредованный комплементом цитолизис, зависящую от антитела клеточную цитотоксичность, изменение физиологической функции RG1 и/или ингибирование связывания лигандов или путей трансдукции сигналов. Антитела к RG1, конъюгированные с токсическими агентами, такими как ризин или радиоактивные изотопы, также можно применять при терапии для введения токсического агента непосредственно в несущие RG1 опухолевые клетки предстательной железы, тем самым разрушая опухолевые клетки.

Иммунотерапию рака предстательной железы с использованием антител к RG1 можно осуществлять согласно различным подходам, с успехом применявшимся по отношению к другим типам рака, которые включают (но не ограничиваясь ими) рак ободочной кишки (Arlen и др., Crit. Rev. Immunol., 18: 133-138, 1998), множественную миелому (Ozaki и др., Blood, 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari и др., Blood, 90: 2437-2444, 1997), рак

желудка (Kasprzyk и др., *Cancer Res.*, 52: 2771-2776, 1992), В-клеточную лимфому (Funakoshi и др., *Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19: 93-101, 1996), лейкоз (Zhong и др., *Leuk. Res.*, 20: 581-589, 1996), колоректальный рак (Moun и др., *Cancer Res.*, 54: 6160-6166, 1994; Velders и др., *Cancer Res.*, 55: 4398-4403, 1995) и рак
5 молочной железы (Shepard и др., *J. Clin. Immunol.*, 11: 117-127, 1991).

Изобретение относится также к вакцинам, в состав которых входит полипептид RG1 или его фрагмент. Применение опухолевого антигена в вакцине для получения гуморального и опосредуемого клеткой иммунитета для противораковой терапии хорошо известно в данной области и ранее нашло применение при раке предстательной железы с использованием в
10 качестве иммуногенов человеческого PSMA и PAP грызунов (Hodge и др., *Int. J. Cancer*, 63: 231-237, 1995; Fong и др., *J. Immunol.*, 159: 3113-3117, 1997). Такие методы можно легко адаптировать на практике для использования полипептида RG1 или его фрагмента или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей RG1, и рекомбинантного вектора, обладающего способностью экспрессировать и соответствующим образом презентировать
15 иммуноген RG1.

Например, для введения кодирующей RG1 молекулы нуклеиновой кислоты можно применять системы, основанные на использовании вирусных генов. Различные системы введения, основанные на использовании вирусных генов, которые можно применять для практического воплощения настоящего изобретения, включают (но не ограничиваясь ими)
20 вирусы коровьей оспы, оспы домашней птицы, оспы канареек, аденовирус, вирус гриппа, полиовирус, аденоассоциированный вирус, лентивирус и синдбус-вирус (Restifo в: *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 658-663, 1996). Также можно применять невирусные системы введения с использованием "оголенной" ДНК, кодирующей полипептид RG1 или его фрагмент, которую вводят пациенту (т.е. внутримышечно) для того, чтобы индуцировать
25 противоопухолевый ответ. Согласно одному из вариантов можно применять полноразмерную человеческую кДНК rg1. Согласно другому варианту можно применять фрагменты человеческой кДНК rg1. Согласно еще одному варианту можно применять молекулы нуклеиновой кислоты rg1, кодирующие специфические эпитопы Т-лимфоцитов (цитотоксические лимфокины, CTL). CTL-эпитопы можно выявлять с использованием
30 определенных алгоритмов (например, Epimer, Brown University), которые позволяют идентифицировать пептиды в полипептиде RG1, обладающие способностью оптимально связываться со специфическими аллелями главного комплекса гистосовместимости человека (HLA).

Также можно использовать различные стратегии *ex vivo*. Один из подходов включает
35 применение дендритных клеток для презентации полипептида RG1 иммунной системе пациента в качестве антигена. Дендритные клетки экспрессируют молекулы класса I и II МНС (главный комплекс гистосовместимости), В7-костимулятор и IL-12, и вследствие этого они являются высоко специализированными антигенпрезентирующими клетками. При раке предстательной железы аутологичные дендритные клетки, запускаемые пептидами
40 специфичного для предстательной железы мембранного антигена (PSMA), применяют на фазе I клинического опыта для стимулирования иммунной системы пациентов, страдающих раком предстательной железы (Tjoa и др., *Prostate*, 28: 65-69, 1996; Murphy и др., *Prostate*, 29: 371-380, 1996). Дендритные клетки можно использовать для презентации полипептидов RG1 Т-клеткам в контексте молекул класса I и II МНС. Согласно одному из
45 вариантов осуществления аутологичные дендритные клетки запускают с помощью полипептидов RG1, которые обладают способностью связываться с молекулами МНС. Согласно другому варианту осуществления дендритные клетки запускают с помощью полноразмерного полипептида RG1. Согласно еще одному варианту осуществления в дендритных клетках создают сверхэкспрессию гена rg1 с использованием различных
50 обеспечивающих решение задачи векторов, хорошо известных в данной области, таких как аденовирус (Arthur и др., *Cancer Gene Ther.*, 4: 17-25, 1997), ретровирус (Henderson и др., *Cancer Res.*, 56: 3763-3770, 1996), лентивирус, аденоассоциированный вирус, трансфекции ДНК (Ribas и др., *Cancer Res.*, 57: 2865-2869, 1997) и трансфекции

полученной из опухоли РНК (Ashley и др., J. Exp. Med., 186: 1177-1182, 1997).

Антиидиотипические антитела к RG1 также можно использовать для противораковой терапии в виде вакцины для индукции иммунного ответа на клетки, экспрессирующие полипептид RG1. В частности, получение антиидиотипических антител хорошо известно в
5 данной области, и эти методы легко адаптировать для получения антиидиотипических антител к RG1, имитирующих эпитоп на полипептиде RG1 (см, например, Wagner и др., Hybridoma, 16: 33-40, 1997; Foon и др., J. Clin. Invest., 96: 334-342, 1995; Herlyn и др., Cancer Immunol Immunother, 43: 65-76, 1996). Такое антиидиотипическое антитело можно применять для антиидиотипической терапии, как это в настоящее время
10 применяется на практике с использованием других антиидиотипических антител к опухолевым антигенам.

Методы генетической иммунизации можно применять для получения профилактических или терапевтических гуморальных и клеточных иммунных ответов на раковые клетки, экспрессирующие RG1. С использованием описанных выше кодирующих RG1 молекул ДНК
15 конструкции, которые содержат ДНК, кодирующую полипептид/иммуноген RG1 и соответствующие регуляторные последовательности, можно инъектировать непосредственно в мышцу или кожу индивидуума, в результате чего клетки мышцы или кожи получают конструкцию и экспрессируют кодируемый полипептид/иммуноген RG1. Полипептид/иммуноген RG1 может экспрессироваться в виде полипептида клеточной
20 поверхности или секретироваться. Экспрессия полипептида/иммуногена RG1 приводит к получению профилактического или терапевтического гуморального и клеточного иммунитета к раку предстательной железы. Можно применять различные профилактические и терапевтические методы генетической иммунизации, известные в данной области (для обобщения данных см. информацию и ссылки, опубликованные на
25 сайте Интернета www.genweb.com).

Антисмысловые олигонуклеотиды, антисмысловые векторы и рибозимы

Антисмысловые полинуклеотиды, комплементарные rg1, можно получать синтетическим путем. Такие олигонуклеотиды можно вводить в клетки с помощью липидов, которые способствуют проникновению антисмысловых олигонуклеотидов в клетки, или без них.

В альтернативном варианте экспрессионные векторы, полученные из ретровируса, аденовируса, вируса герпеса простого или вируса коровьей оспы или из различных бактериальных плазмид, можно применять для конструирования и введения
30 рекомбинантных векторов, которые могут экспрессировать антисмысловой rg1 (см., например, методы, описанные у Sambrook и др., (выше) и у Ausubel и др., (выше)).

Полинуклеотиды, включающие полноразмерную последовательность кДНК и/или регуляторные элементы, дают возможность исследователям применять полинуклеотиды
35 rg1 в качестве инструмента для изучения смысловых цепей (Yousoufian и Lodish, Mol. Cell. Biol., 13: 98-104, 1993) или антисмысловых цепей (Eguchi и др., Annu. Rev. Biochem., 60: 631-652, 1991) с целью регуляции функции гена. Такой метод хорошо
40 известен в данной области и смысловые или антисмысловые олигомеры или более крупные фрагменты можно конструировать из различных участков, находящихся на кодирующих или контролирующих областях.

Гены, кодирующие RG1, можно выключать путем трансфекции клетки или ткани экспрессионными векторами, для которых характерны высокие уровни экспрессии
45 требуемого фрагмента полинуклеотида rg1. Такие конструкции могут повышать в клетках количество нетранслируемых смысловых или антисмысловых последовательностей. Даже в отсутствие интеграции в ДНК такие векторы могут продолжать транскрибировать молекулы РНК до тех пор, пока все копии не будут уничтожены эндогенными нуклеазами. Кратковременная экспрессия может продолжаться в нереплицирующемся векторе в
50 течение месяца или более и даже в течение еще более длительного срока, если соответствующие элементы репликации входят в состав векторной системы.

Как отмечало ранее, модификацию экспрессии гена можно получить путем создания антисмысловых молекул, ДНК или РНК для контролируемых областей rg1, т.е. промоторов,

энхансеров и интронов. Олигонуклеотиды, полученные из сайта инициации транскрипции, например, из областей, простирающихся от -10 до +10 пар оснований лидерной последовательности, являются предпочтительными. Антисмысловые молекулы также можно конструировать с целью блокады трансляции мРНК, препятствуя связи транскрипта с рибосомами. Аналогично этому ингибирование может быть достигнуто с помощью методики "трехспирального" спаривания оснований. Трехспиральное спаривание ухудшает способность двойной спирали открываться в достаточной степени для связывания с полимеразой, факторами транскрипции или регуляторными молекулами. Современные успешные терапевтические подходы, основанные на использовании трехцепочечной ДНК, обобщены у Gee J.E. с соавторами (в: Hurber и Car, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994).

Рибозимы представляют собой обладающие ферментативной активностью молекулы РНК, которые могут катализировать специфическое расщепление РНК (патент US 4987071; WO 93/23057). Механизм действия рибозима включает специфическую для последовательности гибридизацию молекулы рибозима с комплементарной РНК-мишенью с последующим эндонуклеолитическим расщеплением. Под объем изобретения подпадают сконструированные, несущие мотив в виде молотообразной головки молекулы рибозима, которые могут специфично и эффективно катализировать эндонуклеолитическое расщепление РНК, кодирующей RG1. Специфические сайты расщепления рибозимом на любой потенциальной РНК-мишени сначала идентифицируют с помощью сканирования молекулы-мишени в отношении сайтов расщепления рибозимом, которые включают следующие последовательности: GUA, GUU и GUC. После идентификации короткие последовательности РНК длиной от 15 до 20 рибонуклеотидов, соответствующие области гена-мишени, которая содержит сайт расщепления, можно оценить в отношении особенностей вторичной структуры, которые могут сделать олигонуклеотид неоперабельным. Пригодность выбранных мишеней также можно оценить путем определения возможности гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами с помощью анализов, основанных на защите от рибонуклеазы (Irie и др., *Advance. Pharmacol.*, 40: 207-257, 1997).

Антисмысловые молекулы и рибозимы по изобретению можно получать с помощью любого метода, применяемого в данной области для синтеза молекул РНК. Эти методики включают химический синтез олигонуклеотидов, такой как твердофазный фосфорамидитный химический синтез. В альтернативном варианте молекулы РНК можно получать путем транскрипции *in vitro* и *in vivo* или с использованием последовательностей ДНК, кодирующих RG1. Такие последовательности ДНК можно включать в широкое разнообразие векторов с приемлемыми для РНК-полимеразы промоторами, таким как T7 или SP6. В альтернативном варианте в линии клеток, клетки или ткани можно интродуцировать антисмысловые конструкции кДНК, которые синтезируют антисмысловую РНК конститутивно или индуцибельно.

Молекулы РНК можно модифицировать с целью повышения внутриклеточной стабильности и времени полужизни. Возможные модификации включают (но не ограничиваясь ими) добавление фланкирующих последовательностей на 5'- и/или 3'-концы молекул или применение фосфоритоата или 2'-О-метила вместо фосфодиэстерных связей в каркасе молекулы. Повышенную стабильность также можно получать путем включения нетрадиционных оснований, таких как инозит и квеозин, а также ацетил-, метил-, тио- и аналогичным образом модифицированных форм аденина, цитидина, гуанина, тимидина и уридина, которые трудно распознаются эндогенными эндонуклеазами.

Методы интродукции антисмысловых векторов в клетки и ткани включают описанные выше и аналогичные им методы, которые можно применять для терапии *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo*. Для терапии *ex vivo* антисмысловые векторы интродуцируют в клетки, взятые у пациента, и размножают клонированием с целью обратной аутологичной трансплантации этому же пациенту, как это описано в патентах США 5399493 и 5437994, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Введение путем трансфекции и с помощью

липосом или других агентов, основой которых являются или не являются липиды, хорошо известно в данной области.

Анализы с целью выявления агентов, связывающихся с RG1

Настоящее изобретение относится также к анализам и способам, которые можно
5 применять для идентификации агентов, связывающихся с RG1. В частности, агенты, связывающиеся с RG1, можно выявлять по способности лиганда к RG1 или другого агента или его составляющего связываться с RG1 и/или по их способности ингибировать/стимулировать активность RG1.

В альтернативном варианте агенты, которые связываются с полипептидом RG1, можно
10 выявлять с помощью двухгибридной системы на основе дрожжей или с использованием анализа захвата связывания. При использовании двухгибридной системы на основе дрожжей одну единицу экспрессии, кодирующую слитый протеин, которая включает одну из двух субъединиц фактора транскрипции и полипептида RG1, интродуцируют и экспрессируют в клетке дрожжей. Клетку дополнительно модифицируют так, чтобы она
15 включала (1) единицу экспрессии, кодирующую обнаруживаемый маркер, для экспрессии которого необходимы две субъединицы фактора транскрипции, и (2) единицу экспрессии, кодирующую слитый протеин, состоящую из второй субъединицы фактора транскрипции и клонированного сегмента ДНК. Если клонированный сегмент ДНК кодирует протеин, который связывается с полипептидом RG1, то экспрессия приводит к взаимодействию RG1
20 и кодируемого протеина. Это приводит к тесному взаимодействию двух единиц фактора транскрипции, позволяющему восстановить фактор транскрипции. Это приводит к обнаруживаемой экспрессии маркера. Использование двухгибридной системы на основе дрожжей особенно ценно для скрининга библиотеки кДНК, кодирующей сегменты партнеров RG1 для клеточного связывания.

Полипептиды RG1, которые можно применять в вышеуказанных анализах, включают (но
25 не ограничиваясь ими) выделенный полипептид RG1, фрагмент полипептида RG1, клетку, которая была изменена с целью экспрессии полипептида RG1, или фракцию клетки, которая была изменена с целью экспрессии полипептида RG1. Кроме того, полипептид RG1 может представлять собой полноразмерный полипептид или определенный фрагмент
30 полипептида RG1. Специалисту в данной области должно быть очевидно, что если полипептид RG1 можно применять в этом анализе для выявления связывающихся с ним агентов, например, на основе оценки изменения молекулярной массы или активности, то можно использовать описанный метод анализа.

Метод, применяемый для выяснения того, связывается ли агент/клеточный компонент с
35 полипептидом RG1, прежде всего должен базироваться на природе используемого полипептида RG1. Например, анализ на замедление подвижности в геле можно использовать для определения того, связывается ли агент с RG1 или его фрагментом. В альтернативном варианте иммунологический анализ и анализ с использованием биочипа можно адаптировать для применения с полипептидом RG1. Специалист может легко
40 применить различные известные в данной области методики для определения того, связывается ли конкретный агент с полипептидом RG1.

Агенты и клеточные компоненты также можно оценивать в отношении их способности модулировать активность полипептида RG1 с помощью анализа с использованием
45 бесклеточной системы или анализа с помощью клеточной системы. По мере того, как активности полипептида RG1 становятся более выраженными, можно применять функциональные анализы, основанные на определении активности.

В контексте настоящего описания считается, что агент антагонизирует активность RG1, когда агент снижает активность RG1. Предпочтительный антагонист должен избирательно антагонизировать RG1, не оказывая воздействия на любые другие клеточные протеины.
50 Кроме того, предпочтительный антагонист должен снижать активность RG1 более чем на 50%, более предпочтительно более чем на 90%, наиболее предпочтительно полностью ингибировать активность RG1.

Агенты, которые анализируют с помощью описанного выше метода, можно отбирать

случайным образом (произвольно) или отбирать целенаправленно или конструировать. В контексте настоящего описания считается, что агент выбирают случайным образом, когда агент выбирают произвольно без учета специфических последовательностей полипептида RG1. Примером источников для произвольного выбора агентов являются банки химических соединений или пептидная комбинаторная библиотека или бульон для выращивания организма или растительный экстракт.

В контексте настоящего описания считается, что агент отбирают целенаправленно или конструируют, когда агент выбирают на неслучайной основе, принимая во внимание последовательность сайта-мишени/или его конформацию, связанную с активностью агента.

Агенты можно целенаправленно отбирать или целенаправленно конструировать с помощью пептидных последовательностей, из которых состоит полипептид RG1. Например, целенаправленно отобранный пептидный агент может представлять собой пептид, аминокислотная последовательность которого идентична аминокислотной последовательности фрагмента полипептида RG1.

Агенты, которые анализируют с помощью описанных выше методов, могут представлять собой, например, пептиды, антитела, олигонуклеотиды, небольшие молекулы и производные витаминов, а также углеводы. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что для агентов, применяемых в настоящем методе скрининга, не существует ограничений, связанных со структурными особенностями. Одним из классов агентов по изобретению являются пептидные агенты, аминокислотные последовательности которых выбирают с учетом аминокислотной последовательности полипептида RG1.

Пептидные агенты можно получать с помощью стандартных методов твердофазного (или жидкофазного) синтеза пептидов, которые известны в данной области. Кроме того, ДНК, кодирующую эти пептиды, можно синтезировать с помощью имеющегося в продаже инструментария для синтеза олигонуклеотидов и получать методом рекомбинации с использованием систем для получения рекомбинантов. Получение с использованием твердофазного синтеза пептидов является необходимым, если требуется включить аминокислоты, которые не кодируются геном.

Еще одним классом агентов по настоящему изобретению являются антитела, иммунореактивные в отношении имеющих решающее значение положений полипептида RG1. Как обсуждалось выше, антитела получают иммунизацией приемлемых млекопитающих пептидами, содержащими антигенные области, те участки полипептида RG1, которые должны представлять собой мишень для антител. Такие агенты можно применять для анализов конкурентного связывания при идентификации второго поколения ингибирующих агентов, а также для блокады активности RG1.

Клеточные экстракты, которые анализируют с помощью методов по настоящему изобретению, могут представлять собой, например водные экстракты клеток или тканей, органические экстракты клеток или тканей или частично очищенные клеточные фракции. Специалистам в данной области должно быть очевидно, что не существует ограничений, связанных с источником клеточного экстракта, применяемого для метода скрининга по настоящему изобретению.

Агенты, которые связываются с полипептидом RG1, такие как антитела к RG1, можно применять для модуляции активности RG1, для направленного переноса противоракового агента к соответствующим клеткам млекопитающих или для выявления агентов, которые блокируют взаимодействие с RG1. Клетки, экспрессирующие RG1, можно направлять или идентифицировать с помощью агентов, которые связываются с RG1.

Метод применения агентов, связывающихся с RG1, зависит от природы связывающегося с RG1 агента. Например, связывающийся с RG1 агент можно применять для переноса конъюгированных токсинов, таких как дифтерийный токсин, холерный токсин, рицин или экзотоксин *Pseudomonas*, в экспрессирующую RG1 клетку; модуляции активности RG1; для целенаправленного уничтожения экспрессирующей RG1 клетки; или для скрининга с целью выявления агентов для конкурентного связывания. Например, ингибирующий RG1 агент можно применять для непосредственного ингибирования роста экспрессирующих RG1

клеток, в то время как связывающийся с RG1 агент можно использовать в качестве агента для диагностики.

Фармацевтические композиции и пути введения

Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, которые
5 могут включать полинуклеотиды rg1, полипептиды RG1, антитела, агонисты, антагонисты или ингибиторы индивидуально или в сочетании по меньшей мере с одним другим агентом, таким как стабилизатор, которые можно вводить в любом стерильном биосовместимом фармацевтическом носителе, включая (но не ограничиваясь ими) физиологический
10 раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу и воду. Любые из указанных молекул можно вводить пациенту индивидуально или в сочетании с другими агентами, лекарственными средствами или гормонами, которые в фармацевтических композициях смешивают с эксципиентом(ами) или фармацевтически приемлемыми носителями. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель является фармацевтически инертным.

Настоящее изобретение относится также к путям введения фармацевтических композиций. Введение осуществляют перорально или парентерально. Парентеральное введение включает местное, внутриартериальное (непосредственно в опухоль), внутримышечное, подкожное, интрамедуллярное, интритрахеальное, интравентрикулярное, внутривенное, внутрибрюшинное или интраназальное введение.
20 Помимо действующих веществ эти фармацевтические композиции могут содержать пригодные фармацевтически приемлемые носители, включая эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают приготовление на основе действующих веществ препаратов, которые можно применять в фармацевтике. Дополнительные подробности методов приготовления и введения можно найти в последнем издании
25 Remington's Pharmaceutical Science (изд. Maack Publishing Co., Easton Pa).

Фармацевтические композиции для перорального введения можно приготавливать с использованием хорошо известных в данной области носителей в виде дозируемых форм, пригодных для перорального введения. Такие носители позволяют приготавливать фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей,
30 сиропов, суспензий и т.п., предназначенных для приема внутрь пациентами.

Фармацевтические препараты для перорального введения можно получать объединением действующих веществ с твердым эксципиентом, необязательно измельчением образовавшейся смеси и обработкой смеси гранул после добавления при необходимости приемлемых вспомогательных веществ с получением ядер таблеток или
35 драже. Приемлемые эксципиенты включают углеводные или протеиновые наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; крахмал, полученный из кукурузы, пшеницы, риса, картофеля или других растений; целлюлозу, такую как метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза натрия; и камеди, включая гуммиарабик и трагакант; и протеины, такие как желатин и коллаген.
40 При необходимости можно добавлять разрыхлители или солиubilизаторы, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота и ее соли, такие как альгинат натрия.

На ядра драже наносят приемлемые покрытия, такие как концентрированные сахарные растворы, которые могут также включать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон,
45 гелеобразующий агент карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и приемлемые органические растворители или смеси растворителей. В покрытия таблеток или драже также можно добавлять красители или пигменты с целью идентификации или для характеристик количества действующего веществ в дозируемой форме.

Фармацевтические препараты, которые можно применять перорально, включают легко
50 проглатываемые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие запечатанные капсулы, изготовленные из желатина и имеющие покрытие из глицерина или сорбита. Легко проглатываемые капсулы могут содержать действующие вещества в смеси с наполнителем или связующими веществами, таким как лактоза или крахмалы, замасливателями, такими

как тальк или стеарат магния, и необязательно стабилизаторами. В мягких капсулах действующие вещества можно растворять или суспендировать в приемлемых жидкостях, таких как жирные масла, вазелин или жидкий полиэтиленгликоль, с добавлением стабилизаторов или без них.

5 Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы действующих веществ. Для инъекции фармацевтические композиции по изобретению можно приготавливать в водных растворах, предпочтительно в физиологически приемлемых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингерна или забуференный фосфатом физиологический раствор. Водные суспензии для инъекций могут
10 содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Кроме того, суспензии действующих веществ можно получать в виде соответствующих масляных суспензий для инъекций. Приемлемые липофильные растворители или носители включают жирные
15 масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Необязательно суспензия может также включать приемлемые стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость соединений, что позволяет получать высоко концентрированные растворы.

Для местного или назального применения в композиции используют смачивающие (увеличивающие проникновение) вещества, соответствующие конкретному барьеру, через
20 который необходимо проникнуть. Такие смачивающие вещества хорошо известны в данной области.

Наборы

Изобретение относится также в фармацевтическим упаковкам и наборам, содержащим один или несколько контейнеров, включающим один или несколько ингредиентов
25 описанных выше композиций по изобретению. Применяемые в наборе такой(ие) контейнер(ы) должен(ны) удовлетворять законодательным требованиям, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которые утверждены учреждением, уполномоченным осуществлять контроль за производством, применением и продажей продуктов, которые можно вводить людям.

30 Производство и хранение

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно приготавливать хорошо известным методом, например, с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, грануляции, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, капсулирования, улавливания или лиофилизации.

35 Фармацевтические композиции можно получать в виде соли и можно готовить добавлением кислот, которые включают (но не ограничиваясь ими) соляную, серную, уксусную, молочную, винную, яблочную, янтарную кислоту и др. Соли потенциально являются более растворимыми в водных и других протонных растворителях, чем соответствующие формы в виде свободных оснований. В других случаях
40 предпочтительный препарат может представлять собой лиофилизированный порошок в 1-5 mM растворе гистидина, 0,1-2%-ном растворе сахарозы, 2-7%-ном растворе маннита при pH 4,5-5,5, который перед применением объединяют с буфером.

После приготовления фармацевтических композиций, которые включают действующее вещество по изобретению в приемлемом носителе, их можно помещать в соответствующий
45 контейнер и снабжать этикеткой с указанием схемы лечения конкретного состояния. Для введения RG1 такая этикетка должна содержать сведения о количестве, частоте и пути введения.

Терапевтически эффективная доза

Фармацевтические композиции, которые можно применять согласно настоящему
50 изобретению, включают композиции, в которых действующее вещество присутствует в эффективном количестве для достижения поставленной цели, т.е. лечения определенного болезненного состояния, для которого характерна экспрессия RG1. Определение эффективной дозы находится в компетенции специалистов в данной области.

Для любого соединения терапевтически эффективную дозу можно первоначально определять либо с помощью тестов на культурах клеток, например, неопластических клеток, либо с использованием в качестве моделей животных, как правило, мышей, кроликов, собак или свиней. Моделирование на животных также применяют для оценки

5 требуемого диапазона концентраций и пути введения. Такую информацию затем можно использовать для определения приемлемых доз и путей введения людям.

Терапевтически эффективная доза соответствует количеству протеина или антитела к нему, его антагонистов или ингибиторов, которое облегчает симптомы или состояние.

Терапевтическую эффективность и токсичность таких соединений можно определять с помощью стандартных фармацевтических методов с использованием культур клеток или экспериментальных животных, например с определением ED₅₀ (доза, обладающая

10 терапевтической эффективностью для 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз, обладающих терапевтическим и токсическим действиями, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде соотношения

15 ED₅₀/LD₅₀. Предпочтительными являются фармацевтические композиции, которые имеют высокий терапевтический индекс. Данные, полученные с помощью анализов на культурах клеток и опытов на животных, используют для определения диапазона доз, предназначенных для введения людям. Дозы таких соединений предпочтительно находятся в диапазоне концентраций в кровотоке, соответствующих величине ED₅₀,

20 которая обладает низкой токсичностью или является нетоксичной. Варьирование доз в указанном диапазоне зависит от применяемой дозируемой формы, чувствительности пациента и пути введения.

Точную дозу выбирает каждый лечащий врач в зависимости от подлежащего лечению пациента. Доза и путь введения регулируются так, чтобы обеспечивать уровни

25 фрагментов, достаточные для проявления активности или поддержания требуемого действия. Дополнительные факторы, которые следует учитывать, включают серьезность болезненного состояния, например, размер и локализацию опухоли; возраст и вес пациента; диету, время и частоту введения, комбинацию(ии) лекарственных средств, реакционные чувствительности и переносимость/реакцию на лечение. Фармацевтические

30 композиции для длительного применения можно вводить каждые 3-4 дня, каждую неделю или один раз в каждые две недели в зависимости от времени полужизни и скорости клиренса конкретной композиции.

Нормальные уровни доз могут варьироваться от 0,1 до 100000 мкг вплоть до общей дозы примерно 1 г в зависимости от пути введения. Рекомендации, касающиеся конкретных

35 доз и путей их введения, известны из литературы (см. патенты US 4657760; 5206344 или 5225212). Специалисты в данной области могут готовить различные композиции для полинуклеотидов и протеинов или их ингибиторов. Аналогично этому, введение полинуклеотидов или полипептидов должно быть специфично в отношении конкретных клеток, условий, местоположений и т.д.

40 Ниже настоящее изобретение проиллюстрировано с помощью примеров. Примеры даны только с целью иллюстрации изобретения со ссылкой на конкретные варианты осуществления. Эти примеры, иллюстрирующие конкретные объекты изобретения, не ограничивают объем изобретения.

Все примеры осуществляли с помощью стандартных методов, хорошо известных и

45 общепринятых для специалистов в данной области, в противном случае они подробно описаны. Стандартные методы молекулярной биологии, применяемые в приведенных ниже примерах, можно осуществлять согласно стандартным руководствам по проведению лабораторных экспериментов, таким как Sambrook и др., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2-е изд.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

50 Пример 1: Идентификация человеческого полинуклеотида rg1

Rg1 идентифицировали в качестве гена, экспрессируемого в предстательной железе с использованием базы данных Incyte's LifeSeq. Нуклеотидную последовательность идентифицировали путем аннотационного поиска с использованием в качестве

инструмента для анализа базы данных, предоставленной фирмой Incyte программы "Protein Function". Нуклеотидная последовательность была обнаружена в категории молекул клеточной адгезии в аннотационной базе данных и описана в качестве гомолога f-спондина. Электронный Нозерн-анализ распределения полинуклеотидных

5 последовательностей rg1 в наборе библиотек в базе данных подтвердил, что высокий уровень экспрессии rg1 обнаружен в библиотеке предстательной железы и более низкие уровни в целом ряде библиотек других тканей, в том числе как нормальных, так и опухолевых тканей.

10 После сборки набора клонов rg1 в базе данных в непрерывную полинуклеотидную последовательность и редактирования непрерывной последовательности была идентифицирована полноразмерная кодирующая последовательность в предсказанном собранном полинуклеотиде. Эта последовательность кодировала протеин, гомологичный f-спондину и Миндину-2.

15 Клоны фирмы Incyte 1640796, 1712252 и 1880265 получали на основе экспериментальных исследований фирмы Incyte, а клон 3360733 идентифицировали в качестве клона, содержащего большую часть 5'-нуклеотидной последовательности. Этот клон полностью секвенировали и установлено, что он содержит полноразмерную кодирующую последовательность предсказанного протеина RG1. Эта последовательность представлена на фиг.1 (SEQ ID NO:1).

20 Пример 2: Экспрессия мРНК rg1

Уровень экспрессии мРНК rg1 в различных образцах нормальных и опухолевых тканей и в линиях клеток определяли с помощью полуколичественной ПЦР и Taqman-анализа (фирма Perkin-Elmer). Образцы нормальной ткани, доброкачественной и злокачественной опухоли предстательной железы, классифицированные согласно модифицированной 25 системе классификации Глеасона (Gleason), получали из отделения урологии медицинской школы Стэнфордского Университета (Stanford University School of Medicine). Из образцов выделяли РНК с помощью стандартных методов. РНК из других опухолевых и нормальных тканей получали из поступающих в продажу образцов, включая образцы фирм Clonetech и Biochain. Линии клеток опухоли предстательной железы (PC-3, LNCaP и 30 DU145) получали из американской коллекции типовых культур и размножали в культуре стандартными методами с использованием содержащей сыворотку среды. Полученные из этих линий клеток ксенотрансплантаты опухолей имплантировали бестимусным мышам и выделяли из мышей примерно через 4-6 недель после имплантации. С помощью стандартных методов из этих опухолей выделяли РНК.

35 Основанную на Taqman-анализе ПЦР осуществляли с использованием праймеров: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (SEQ ID NO:3) и GCC GCC TCC GCA AAG (SEQ ID NO:4) и Taqman-зонда: 6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (SEQ ID NO:5).

40 Эти праймеры и зонд конструировали с использованием программного обеспечения Perkin Elmer's Primer Express и синтезировали с помощью фирмы Synthetic Genetics. ПЦР осуществляли с использованием 30-40 циклов и результат количественно оценивали с использованием РНК предстательной железы для получения стандартной кривой, которую применяли для сравнительного анализа. Этот анализ продемонстрировал, что наиболее высокое содержание мРНК rg1 обнаружено в предстательной железе, а в ряде других 45 тканей этот уровень значительно ниже (см. фиг.5).

Пример 3: Клонирование и экспрессия RG1 в клетках линии ВНК

Кодирующую область RG1 получали из плазмиды 3360733 фирмы Incyte. Кодирующую последовательность подвергали ПЦР-амплификации с использованием праймеров SST115 (5'-TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCCGGC-3') (SEQ ID NO:6) и SST113 (5'- 50 AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (SEQ ID NO:7) в стандартной ПЦР (100 мкл), используя однократный (1x) буфер для полимеразы Pfu Turbo (фирма Stratagene, Ла Джолла, штат Калифорния)/200 мкМ дНТФ/0,2 мкМ олигонуклеотидные праймеры/2,5 ед. полимеразы Pfu Turbo (фирма Stratagene). Использовали следующие

условия ПЦР-амплификации: 3 мин при 95°C (15 с при 95°C, 30 с при 60°C, 2 мин при 72 °C) ×35, 7 мин при 72°C. Образовавшийся продукт ПЦР-амплификации очищали с помощью колонки типа QIAquick PCR (фирма Qiagen, Валенсия, штат Калифорния) и расщепляли с помощью рестриктаз XbaI и PmlI, получая фрагмент длиной 1010 пар оснований, который очищали на 1% агарозном геле, используя набор BIO 101 GeneClean (фирма Vista, штат Калифорния). Очищенный фрагмент встраивали путем лигирования (используя набор Epicentre Fast Link (фирма Epicenter, Мэдисон, штат Висконсин) с нецитопатогенным экспрессионным вектором фирмы Sindbis pSINrep 21 (Агаров и др., PNAS, 95: 12989-12994, 1998), расщепленным с помощью XbaI и PmlI, и трансформировали компетентные клетки линии DH5 альфа (фирма Life Technologies, Гейтерсберг, штат Калифорния) и отбирали на агаровых LB-планшетах, содержащих ампициллин (100 мкг/мл). Одну такую устойчивую к ампициллину колонию выращивали в LB-среде с ампициллином и с помощью анализа последовательности установлено, что она содержит встроенную кодирующую последовательность RG1. Эту плазмиду обозначали как pPEG6.

2 мкг pPEG6 использовали для трансфекции $1-3 \times 10^5$ клеток почки детеныша хомяка (ВНК), используя реагент Липофектамин Плюс (фирма Life Technologies, Гейтерсберг, штат Калифорния) согласно инструкциям производителя. После трансфекции клетки инкубировали в среде DMEM, дополненной фетальной бычьей сывороткой, в течение 24-48 ч, в этот промежуток времени клетки разводили в соотношении 1:10 и осуществляли отбор в отношении содержащих плазмиды клеток, который инициировали путем добавления пурамицина (конечная концентрация 2,5 мкг/мл) и среды DMEM, дополненной сывороткой. После достижения клетками конfluence (через 4-5 дней после добавления пурамицина) клетки промывали 3ФР, разводили в соотношении 1:10 и добавляли среду DMEM, дополненную сывороткой и 5 мкг/мл пурамицина. Еще через 2-3 дня среду заменяли бессывороточной средой DMEM, содержащей 5 мкг/мл пурамицина, выращивали в течение 2-3 дней и присутствие протеина RG1 в среде выявляли методом Вестерн-блоттинга с использованием антител к RG1. Обнаружена концентрация протеина RG1 1 мкг/мл.

Пример 4: Получение антител

Получали кроличью поликлональную антисыворотку к 5 синтетическим полипептидным последовательностям, выведенным из последовательности протеина RG1. Эти последовательности были выбраны из-за их предполагаемой локализации на поверхности протеина с целью получения антисыворотки, которую легче различать поверхностным эпитопами. Остатки цистеина для синтеза заменяли аминокислотой (Abu). Ниже для 5 пептидов приведены специфические аминокислотные последовательности, их положения в протеине RG1 и обозначения.

Обозначение	Положение	Аминокислотная последовательность
C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO:8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFFPKQYPLFR (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 применения в качестве иммуногена пептиды ковалентно связывали с гемоцианином лимфы улитки (KLH) через дополнительный С-концевой цистеин. Аналогично этому, готовили конъюгат бычьего сывороточного альбумина (BSA) для анализа титров антисыворотки с помощью ELISA.

Каждым пептидом иммунизировали двух животных. Сенсibilизацию осуществляли с использованием полного адъюванта Фрейнда (0,5 мг/животное), последующие внутримышечные бустер-инъекции осуществляли с трехнедельными интервалами, используя 0,25 мг/животное в неполном адъюванте Фрейнда. Периодически брали образцы крови для анализа и с помощью ELISA определяли в них титр антител, специфических по отношению к конъюгату BSA-пептид, и сравнивали с данными для преиммунной сыворотки. Установлено, что антисыворотка к пептидам 1C и 3C являлась активной. Антисыворотка к

пептиду 2С не распознавала полипептид RG1. Антисыворотки к пептидам 4С и 5С не анализировали.

Моноклональные антитела к RG1 получали путем иммунизации трансгенных мышей пептидами RG1 и меченным с помощью 6 остатков гистидина слитого протеина RG1, экспрессируемого в *E.coli*. Спленоциты этих животных сливали с клетками миеломы с целью получения клеток гибридомы. С помощью ELISA осуществляли скрининг образовавшихся гибридом в отношении выработки антител к пептидам и протеину RG1.

Пример 5: Анализ антител методом Вестерн-блоттинга

Антисыворотку оценивали в отношении RG1-специфичности с помощью Вестерн-блоттинга. Специфическую антисыворотку к RG1 (полученную при иммунизации последовательностями 1С и 3С, выше) оценивали в отношении кратковременной экспрессии RG1 в COS-клетках, секретиции нативного RG1 из клеток линии LNCaP и производства RG1 в трансфектированных клетках почки детеныша хомяка (ВНК). RG1-специфическую антисыворотку дополнительно изучали с использованием лизатов, полученных из: опухолей LNCaP, клеток LNCaP, опухолей PC-3, клеток PC-3 и нескольких клинических образцов опухолей предстательной железы человека. Клетки и ткани лизировали в детергентном буфере. После кипячения в течение 5 мин 10 мкл каждого лизата вносили в 12% ДСН-полиакриламидный гель с целью разделения протеинов. Затем разделенные протеины переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Специфичность связывания антител к RG1 подтверждали путем связывания в присутствии гомологичных и гетерологичных пептидов. RG1-специфическая антисыворотка выявила протеин во всех образцах кроме клеток PC-3 и опухолей PC-3.

Пример 6: Очистка нативного протеина RG1, секретируемого из клеток LNCaP

С помощью Вестерн-блоттинга установлено, что выращенные в культуре клетки LNCaP секретируют нативный протеин RG1. Для очистки нативного протеина клетки выращивали в течение 48 ч в бессывороточных средах. Эти бессывороточные кондиционированные среды собирали, центрифугировали для удаления любых клеток и концентрировали примерно в 50 раз ультрафильтрацией. Концентрированные среды затем разбавляли в 10 раз 20 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 6,5 и вносили в Q-сефарозную анионообменную колонку. Элюирование колонки осуществляли в градиенте хлорида натрия (0,5% в мин), собирая фракции объемом 2,0 мл. Протеин RG1 элюировался примерно при 75 мМ NaCl, что доказано с помощью Вестерн-блоттинга и ДСН-ПААГ. Полосы, соответствующие нативному протеину RG1, соответствовали маркерам с несколько меньшей молекулярной массой, чем слитый протеин 6His-RG1, экспрессируемый в бактериях, вероятно из-за того, что в нем отсутствует слитый протеин.

Пример 7: Иммуногистохимическое окрашивание с целью выявления экспрессии RG1

Уровень экспрессии протеина RG1 оценивали с помощью наборов фирмы LifeSpan Biosciences Inc. в различных образцах человеческих тканей, включая почку, печень, поджелудочную железу, мышцу, головной мозг и предстательную железу. Дополнительные образцы ткани предстательной железы получали из отделения урологии медицинской школы Стэнфордского Университета и тестировали на Verlex. Из срезов тканей удаляли парафин с помощью стандартных методик. Использовали поликлональное антитело к RG1-3С в качестве первичного антитела, систему выявления, основанную на применении набора ABC-AP (AK5002) и набора Vector red substrate (Sk5002). Для получения отрицательного контроля окрашивание осуществляли в отсутствие первичного антитела.

Все указанные в вышеизложенном описании публикации и патенты включены в него в качестве ссылки. Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области должно быть очевидно, что без отказа от сущности и объема изобретения в него можно вносить различные изменения и эквивалентные замены. Кроме того, могут быть сделаны многочисленные модификации для того, чтобы адаптировать конкретную ситуацию, материал, композицию, процесс, стадию или стадии процесса к сущности и объему настоящего изобретения.

Подразумевается, что такие модификации подпадают под объем приведенной ниже

формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное антитело или фрагмент антитела, специфически связывающиеся с
 - (а) полипептид или его биологически или иммунологически активный фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (б) полипептид, включающий аминокислоты 28-46 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (в) полипептид, включающий аминокислоты 77-91 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (г) полипептид, включающий аминокислоты 188-210 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (д) полипептид, включающий аминокислоты 263-274 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2); и
 - (е) полипептид, который по меньшей мере на 70% идентичен полипептиду, указанному в (а), (б), (в), (г) или (д).
2. Антитело по п.1, где антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO:8).
3. Антитело по п.1, где антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO:10).
4. Антитело по п.1, где антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO:11).
5. Антитело по п.1, где антитело специфически связывается с аминокислотной последовательностью NEIVDSASVPET (SEQ ID NO:12).
6. Антитело по п.1, где антитело представляет собой поликлональное антитело.
7. Антитело по п.1, где антитело представляет собой моноклональное антитело.
8. Антитело по п.1, где антитело представляет собой человеческое антитело.
9. Иммуноконъюгат, включающий выделенное антитело или фрагмент антитела, специфически связывающиеся с полипептидом RG1, выбранным из группы, включающей
 - (а) полипептид или его биологически или иммунологически активный фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (б) полипептид, включающий аминокислоты 21-331 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (в) полипептид, включающий аминокислоты 27-331 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (г) полипептид, включающий аминокислоты 28-46 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (д) полипептид, включающий аминокислоты 77-91 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (е) полипептид, включающий аминокислоты 188-210 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2);
 - (ж) полипептид, включающий аминокислоты 263-274 последовательности, представленной на фиг.2 (SEQ ID NO:2); и
 - (з) полипептид, который по меньшей мере на 70% идентичен полипептиду, указанному в (а), (б), (в), (г), (д), (е) или (ж), конъюгированный с терапевтическим агентом.
10. Иммуноконъюгат по п.9, представляющий собой радиоко́нъюгат, меченный с помощью ^{111}In или ^{90}Y .
11. Иммуноконъюгат по п.9, где терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент.
12. Иммуноконъюгат по п.11, где цитотоксический агент выбирают из группы, включающей ризин, доксорубицин, даунорубицин, таксол, бромид этидия, митомицин,

этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, дигидроксиантрацидион, актиномицин D, дифтерийный токсин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE) A, PE40, абрин, глюкокортикоид и радиоактивные изотопы.

5 13. Иммуноконъюгат по п.9, где фрагменты антитела выбирают из группы, включающей Fv-, F(ab') и F(ab')₂-фрагменты.

14. Способ избирательного разрушения клетки, экспрессирующей полипептид, представленный на фиг.2 (SEQ ID NO:2), предусматривающий взаимодействие иммуноконъюгата по п.9 с клеткой таким образом, что терапевтический агент иммуноконъюгата может разрушать клетку.

10 15. Способ лечения рака предстательной железы, предусматривающий введение пациенту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата по п.10.

16. Способ диагностики рака предстательной железы у пациента посредством измерения сверх экспрессии RG1, предусматривающий

(а) получение из организма пациента ткани предстательной железы;

15 (б) контактирование образца с антителом или фрагментом антитела, которое (ый) специфически связывается с одним или более эпитопами, присутствующими в человеческом полипептиде RG1, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

20 (в) обнаружение в образце связывания антитела или фрагмента антитела с человеческим полипептидом RG1 и

(д) определение, повышен ли уровень связывания в образце, по сравнению с уровнем, обнаруженным в контролях нормы.

17. Способ диагностики метастазов у пациента с раком предстательной железы посредством измерения сверх экспрессии RG1, предусматривающий

25 (а) получение образца ткани, которая не является тканью предстательной железы и/или жидкости из организма пациента;

(б) контактирование образца с антителом или фрагментом антитела, которое (ые) специфически связываются с одними или более эпитопами, присутствующими в человеческом полипептиде RG1, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID

30 NO:2;

(в) обнаружение в образце связывания антитела или фрагмента антитела с человеческим полипептидом RG1 и

(д) определение, повышен ли уровень связывания в образце, по сравнению с уровнем, обнаруженным в контролях нормы.

35 18. Способ по п.17, где антитело или фрагмент антитела метят соединением, выбранным из группы, включающей радиоактивную метку, фермент, хромофор и флуоресцирующий агент для того, чтобы непосредственно или опосредованно вызывать обнаруживаемый сигнал.

40 19. Способ диагностики метастазов у пациента с раком предстательной железы, посредством измерения сверх экспрессии RG1, предусматривающий

(а) введение пациенту радиоактивно меченого антитела или фрагмента антитела, которое(ый) специфически связывается с одним или более эпитопами, присутствующими в человеческом полипептиде RG1, имеющем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

45 (в) обнаружение у пациента с помощью иммуносцинтиграфии связывания радиоактивного меченого антитела или фрагмента антитела с одним или более эпитопами, присутствующими в человеческом полипептиде RG1, и

(д) определение, повышен ли этот уровень связывания у пациента, по сравнению с уровнем, обнаруженным в нормальном контроле.

50 20. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело или фрагмент антитела специфически связывается с аминокислотной последовательностью PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO:8).

21. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело или фрагмент антитела специфически

связывается с аминокислотной последовательностью HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10).

22. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело или фрагмент антитела специфически связывается с аминокислотной последовательностью DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO:11).

23. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело или фрагмент антитела специфически связывается с аминокислотной последовательностью NEIVDSASVPET (SEQ ID NO:12).

24. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело представляет собой поликлональное антитело.

25. Способ по пп.16, 17 или 19, где антитело представляет собой моноклональное антитело.

26. Способ по пп.16, 17 или 19, где фрагмент антитела представляет собой F(ab')₂ фрагмент.

27. Способ по п.19, где радиоактивной меткой является In-111 или Tc-99m.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50


```

AGAAAGGGGTGCGGCAGCACTGCCAGGGGAAGAGGGTGATCCGACCCGGGGAAAGGTGCGT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TCTTTCCCCACGCCGTCGTGACGGTCCCCTTCTCCCACTAGGCTGGGCCCTTCCAGCGA

GGGCAGGGCGAGTTGGGAAAGCGGCAGCCCCCGCCGCCCCCGCAGCCCCCTTCTCCTCCTT
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCCGTCCCGCTCAACCCTTTCGCCGTCGGGGGCGGGCGGGGGCGTCCGGGAAGAGGAGGAA

TCTCCACGTCCTATCTGCCTCTCGCTGGAGGCCAGGCCGTGCAGCATCGAAGACAGGAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGAGGGTGCAGGATAGACGGAGAGCGACCTCCGGTCCGGCACGTCGTAGCTTCTGTCTC

GAACTGGAGCCTCATTGGCCGGCCCCGGGGCGCCGGCCTCGGGCTTAAATAGGAGCTCCGG
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CTTGACCTCGGAGTAACCGCCCCGGCCCCCGGGCCGGAGCCCGAATTTATCCTCGAGGCC

GCTCTGGCTGGGACCCGACCGCTGCCGGCCGGCTCCCGCTGCTCCTGCCGGGTGATGGA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CGAGACCGACCCTGGGCTGGCGACGGCCGGCGGAGGGCGACGAGGACGGCCCACTACCT

b                                                                 H E -

AAACCCAGCCCCGGCCGCCCTGGGCAAGGCCCTCTGGCTCTCCTCCTGGCCACTCT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTTGGGGTGGGGCCGGCCGGGACCCCTTCCGGGAGACGCGAGAGGAGGACCGGTGAGA

b      N P S P A A A L G K A L C A L L L A T L -

CGGCGCCCGCCGAGCCTCTGGGGGAGAGTCCATCTGTTCCGCCGAGCCCCGGCCAA
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GCCCGCCGGCCGGTCCGAGAACCCCTCTCAGGTAGACAAGCGGCCCTCGGGGCCGGTT

b      G A A G Q P L G G E S I C S A G A P A K -

ATACAGCATCACCTTACGGGCAAGTGGAGCCAGACGGCCTCCCCAAGCAGTACCCCT
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TATGTCGTAGTGGAAAGTGCCTTACCTCGGTCTGCCGGAAGGGGTTGTCATGGGGGA

b      Y S I T F T G K W S Q T A F P K Q Y P L -

GTTCCGCCCCCTGCGCAGTGGTCTTCGCTGCTGGGGCCGCGCATAGCTCCGACTACAG
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CAAGGGGGGGGACCGGTACCCAGAAGCGACGACCCCGGGCGGTATCGAGGCTGATGTC

b      F R P P A Q W S S L L G A A H S S D Y S -

CATGTGGAGGAAGAACCAGTACGTACGTAACGGGCTGCGCGACTTTGCGGAGCGCGGCGA
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GTACACCTCCTTCTTGGTCATGCAGTCATTGCCCGACGGCTGAAACGCCCTCGCGCCGCT

b      M W R K N Q Y V S N G L R D F A E R G E -

GGCCTGGGCGCTGATGAAGGAGATCGAGGCGGGGGAGGGCGCTGCAGAGCCTGCACGC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCGGACCCGCGACTACTTCTTAGCTCCGCGCCCCCTCCGCGACGTCCTGCACGTGCG

b      A W A L M K E I E A A G E A L Q S V H A -

GGTGTTCGGCGCCCGCCGTCGCCAGCGGCACCGGGCAGACGTCGGCGGAGCTGGAGGT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CCACAAAAGCCCGGGCGGGCAGGGGTCGCCGTCGGCCGTCGTCAGCCGCCCTCGACCTCCA

b      V F S A P A V P S G T G Q T S A E L E V -

```

ФИГ. 4


```

GCAGCGCAGGCACTCGCTGGTCTCGTTTGGTGGCGCATCGTGCCAGCCCCGACTGGTT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTCGCGTCCGTGAGCGACCCAGAGCAAACACCACCGCTAGCACGGGTCCGGGGCTGACCAA
b   Q R R H S L V S F V V R I V P S P D W F -
CGTGGGCGTGGACAGCCTGGACCTGTGCGACGGGACCGTTGGCGGGAACAGGCGGGCGCT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
GCACCCGCACCTGTGCGACCTGGACACGCTGCCCTGGCAACCGCCCTTGTCCGCCGCGA
b   V G V D S L D L C D G D R W R E Q A A L -
GGACCTGTACCCCTACGACGCCGGGACGGACAGCGGCTTACCTTCTCCTCCCCAACTT
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CCTGCACATGGGGATGCTGCGGCCCTGCCTGTGCGCCGAAGTGAAGAGGAGGGGGTTGAA
b   D L Y P Y D A G T D S G F T F S S P N F -
CGCCACCATCCCGCAGGACACGGTGACCGAGATAACGTCTCTCTCCAGCCACCCGGC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
GCGGTGGTAGGGCGTCTGTGCCACTGGCTCTATTGCAGGAGGAGAGGGTCCGGTGGGCCG
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 -
GCGGCTGCGACAGAGCCCCAGGGCCTTCATCCCTCCCGCCCCAGTCTGCCAGCAGGGA
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGCCGACGCTGTCTCGGGTCCCGGAAGTAGGGAGGGCGGGGTCAGGACGGGTCCGTCCCT
b   R L R Q S P R A F I P P A P V L P S R D -
CAATGAGATTGTAGACAGCGCCTCAGTTCAGAAACGCCGCTGGACTGCGAGGTCTCCCT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
GTTACTCTAACATCTGTGCGGAGTCAAGGTCTTTGCGGCGACCTGACGCTCCAGAGGGA
b   N E I V D S A S V P E T P L D C E V S L -
GTGGTCTCTCTGGGACTGTGCGGAGGCCACTGTGGGAGGCTCGGGACCAAGAGCAGGAC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
CACCAGCAGGACCCCTGACACGCCTCCGGTGACACCCTCCGAGCCCTGGTTCTCGTCTG
b   W S S W G L C G G H C G R L G T K S R T -
TCGCTACGTCCGGGTCCAGCCCCCAACAACGGGAGCCCCCTGCCCGAGCTCGAAGAAGA
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
AGCGATGCAGGCCAGGTCCGGCGGTTGTTGCCCTCGGGGACGGGGCTCGAGCTTCTCT
b   R Y V R V O P A N N G S P C P E L E E E -
GGCTGAGTGCCTCCCTGATAACTGCGTCTAAGACCAGAGCCCCGCAGCCCCCTGGGGCCCC
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
CCGACTCACGCAGGACTATTGACGCAGATTCTGGTCTCGGGGCGTCCGGGACCCCGGG
b   A E C V P D N C V *
CCGGAGCCATGGGGTTCGGGGGCTCCTGTGCAGGCTCATGCTGCAGGCGGGCCGAGGGCA
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
GGCCTCGGTACCCACAGCCCCGAGGACACGTCCGAGTACGACGTCCGCCGGCTCCCGT
CAGGGGGTTTCGGCGTGTCTGACCGCGGTGAGGCCGGCCGACCATCTCTGCACTGAA
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCCCCCAAAGCGGACGAGGACTGGCGCCACTCCGGCGCGGCTGGTAGAGACGTGACTT
GGCCCTCTGGTGGCCGGCACGGCCATTGGGAACAGCCTCCTCCTTCCCAACCTTGCT
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CCCGGAGACCACCGGCCGTCCCGTAACCSTTTGTGCGGAGGAGGAAAGGGTTGGAACGA

```

ФИГ. 4 – продолжение

```

1501 TCTTAGGGGGCCCCGTGTCCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCCTGCAGGATAAAATGCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAATCCCCGGGGGCACAGGGCAGACGAGAGTCGGAGGAGGAGGACGTCCTATTTCAGTA

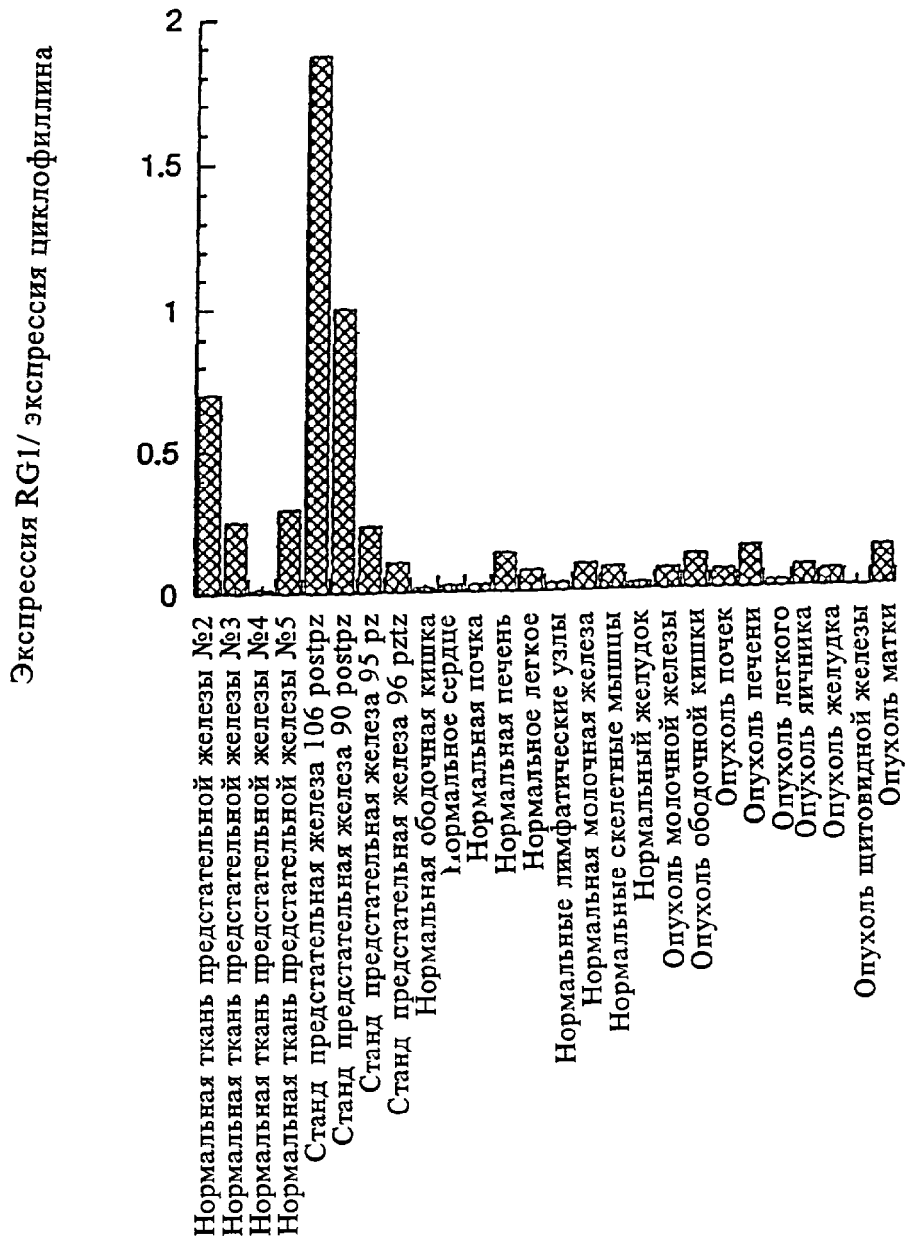
1561 CCCC AAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGTCTCCTTATAAGTTATTGCTGCTCCAGGAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGTCCGAGGTCGATGAGATTTAATACAGAGGAATATTCAATAACGACGAGGTCCTCT

1621 TTGTCCTTCATCGTCCAGGGGCCTGGCTCCACGTGGTTCAGATACCTCAGACCTGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAGGAAGTAGCAGGTCCCCGGACCGAGGGTGCACCAACGTCATGGAGTCTGGACCAC

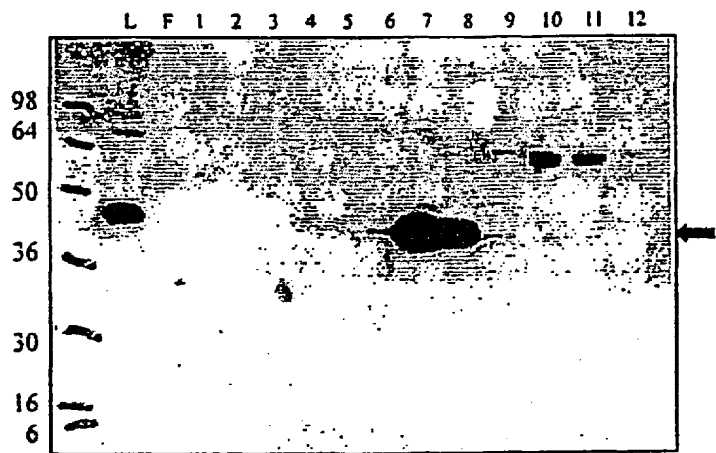
1681 CTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACTCTCCCGAGGGCCATCCAAGCGGGGGCCACTTGAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATCCGACACGACTCGGGTGAGAGGGCTCCCGCGTAGGTCGCCCCCGGTGAACCTTT

1741 GTGAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CASCTATTACCCCGCCAAAGCCTTCGCAG
    
```

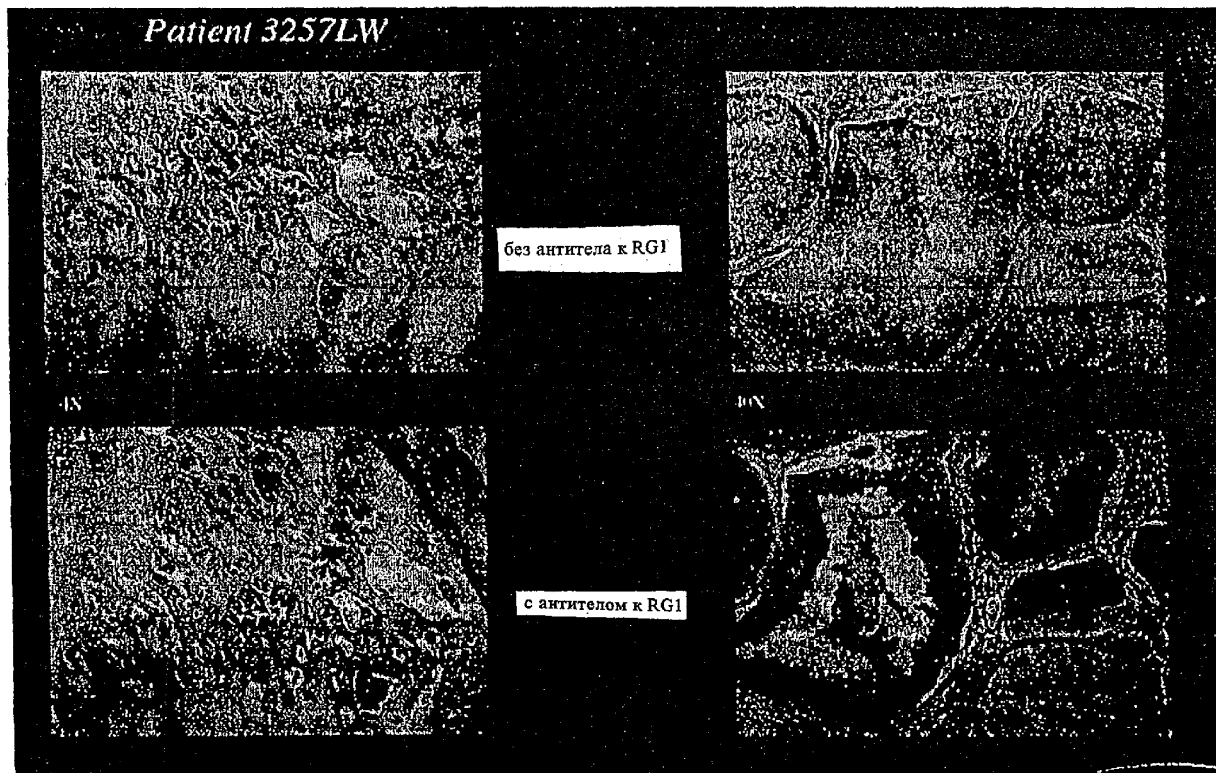
ФИГ. 4 – продолжение



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7