

(19)



(10) **LT 5046 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5046** (51) Int. Cl.⁷: **C07K 14/47**
A61K 47/48
C12N 15/12
C12N 5/10
C07K 16/18
G01N 33/53
C12Q 1/68
A61K 38/17
- (21) Paraiškos numeris: **2002 070**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2002 06 24**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 04 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2003 08 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US00/33901**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2000 12 15**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2002 06 24**
- (30) Prioritetas: **60/172,370, 1999 12 16, US**
09/732.357, 2000 12 07, US
- (72) Išradėjas:
Richard HARKINS, US
Deborah PARKES, US
Gordon PARRY, US
Douglas W. SCHNEIDER, US
Renate STEINBRECHER, US
- (73) Patento savininkas:
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, 13342 Berlin, DE
- (74) Patentinis patikėtinis:
Rita LAURINAVIČIŪTĖ, UAB „Metida“, Gedimino pr. 45-6, LT-2600 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Polinukleotidas, koduojantis RG1 polipeptidą

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su naujais žmogaus ekstraceluliniais matriciniais polipeptidais, pavadintais RG1, šiuos polipeptidus koduojančiais polinukleotidais, polipeptidų gavimo būdais, ekspresijos vektoriais ir genų inžinerijos būdu sukuriamomis šeiminių ląstelių šioms polipeptidams ekspresuoti. Išradimas taip pat yra susijęs su tokių polinukleotidų ir polipeptidų panaudojimo būdais tyrimuose, diagnostikoje ir terapijoje.

LT 5046 B

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra iš dalies susijęs su naujai identifikuotais polinukleotidais ir polipeptidais, polinukleotidų ir polipeptidų variantais ir dariniais, polinukleotidų ir polipeptidų ir jų variantų bei darinių pagaminimo būdais, antikūnais, nukreiptais prieš šiuos polipeptidus, jų variantus ir jų darinius, ir polinukleotidų, polipeptidų, variantų, darinių ir antikūnų panaudojimu. Ypatingai šiuo ir kitais požiūriais išradimas yra susijęs su naujais žmogaus ekstraląsteliniais matriciniais polipeptidais (pavadintais RG1), polinukleotidais, kurie koduoja šiuos polipeptidus, antikūnais, nukreiptais prieš šiuos polipeptidus ir antiprasminiais polinukleotidais, kurie blokuoja RG1 ekspresiją.

IŠRADIMO KILMĖ

Prostatos vėžys yra dažniausiai atsirandanti vyrų liga, ir jis yra diagnozuojamas maždaug trečdaliui vyrų virš 45 metų amžiaus. Yra duomenų ir apie genetines, ir apie aplinkos sukeltas jo priežastis, o daugeliu atvejų jis tikriausiai yra abiejų faktorių derinio pasekmė. Šeimyninio vėžio tyrimai davė pagrindo manyti, kad genetinio polinkio faktorius vaidina vaidmenį maždaug 5-10 % visų prostatos vėžio atvejų ir maždaug 45 % atvejų yra jaunesni nei 55 metų vyrai.

Yra duomenų, kad prostatos vėžys išsivysto kaip daugiastadijinė liga, kurioje pirminis pažeidimas yra prostatos intraepitelio neoplazija (PIN). Ankstyvosios ligos stadijos priklauso nuo androgeno, tačiau vėlyvesnės stadijos nepriklauso nuo hormonų. Proliferacinis prostatos sutrikimas, žinomas kaip gerybinė prostatos hiperplazija, yra dažnai kliniškai nustatomas, bet tikriausiai tai nėra vėžio atsiradimo stadija. Tačiau jis yra dažnai susijęs su prostatos vėžiu. Prostatos vėžys yra dažnai daugiažidininis, paprastai lėtai augantis ir heterogeninis. Vėlyvosiose stadijose vėžys dažnai duoda metastazes limfmazgiuose ir kauluose.

Prostatos vėžys paprastai diagnozuojamas fiziškai apžiūrint ir nustatant prostatai specifinio antigeno (PSA) kiekius serume. Lokalizuotos ligos gydymo pasirinkimas yra radikali prostatektomija. Užleista metastazinė liga dabartiniu metu yra gydoma androgeno pašalinimu, sukeliama pašalinant séklides, arba gydant GnRH (gonadotropiną išlaisvinančiu hormonu) ir anti-endrogenine terapija. Tačiau užleista liga beveik visada pasidaro rezistentiška hormonams ir nėra vaistų ligos progresavimui gydyti. Be to, yra rimti šalutiniai poveikiai, susiję ir su radikalia prostatektomija, ir su androgeno pašalinimo terapija. Jais yra didelė nesulaikymo ir impotencijos rizika, susijusi su radikalia prostatektomija, o kaulų lūžiai ir osteoporozė, yra susiję su androgeno pašalinimo terapija.

Todėl yra labai didelis poreikis naujų terapinių strategijų ir ankstyvajai, ir vėlyvajai prostatos vėžio stadijai. Taip pat yra labai didelis poreikis naujų diagnostinių agentų, ypatingai agentų, kurie gali atskirti ligos stadijas, nes tai turi didžiulę įtaką gydymo priemonių pasirinkimui. Pavyzdžiui, jeigu liga progresuoja už prostatos ir metastazavo limfmazgiuose, radikali prostatektomijos nenaudojama, nes ji neturės įtakos ligos progresavimui, bet gali turėti labai didelį nepageidautiną šalutinį poveikį. Agentas, kuris galėtų aptikti metastazes *in vivo*, turėtų labai svarbią reikšmę.

Prostatos vėžio atveju buvo parodyti būdingų baltymų ekspresijos pokyčiai, įskaitant anomaliją p53 ekspresiją vėlyvojoje prostatos vėžio stadijoje, sumažinti TGF- β receptoriaus kiekiai, sumažinti E-kadherino, C-Cam (ląstelės adhezijos molekulė) ir keleto integrinų kiekiai. Onkogeno bcl-2 ekspresija yra nepaprastai padidinta vėlyvojoje nuo androgeno nepriklausančių auglių stadijoje ir prognozė pacientams, kurių padidinta bcl-2 ekspresija, yra snatykinai bloga. Nors anksčiau minėti genų ekspresijos pokyčiai yra plačiai aprašyti, nebuvo nustatyta jokių genų ekspresijos pokyčių, kad jie būtų ligos priežastis. Todėl turėtų būti naudinga identifikuoti naujus baltymus, kurių ekspresija yra susijusi su buvimu arba atsiradimu prostatos auglių, kurie galėtų tarnauti kaip molekuliniai taikiniai prostatos vėžio diagnozei ir gydymui.

Šiame išradime aprašomas naujas ekstraląstelinis matricinis baltymų pošeimės homologas. Šis homologas, pavadintas RG1, yra ekspresuojamas

prostatos audinyje ir gali būti nenormaliai greitai ekspresuojamas prostatos augliuose.

Ekstraląstelinė matrica yra sudėtingas tinklas iš kolageno ir elastino, įterptų į klampią elastinę pagrindo medžiagą, sudarytą iš proteoglikanų ir glikoproteinų. Matrica egzistuoja kaip tridimensinės palaikančios atramos, kurios skiria audinio sekcijas, tarpininkauja ląsteles prijungiant ir apsprendžia audinio architektūrą (Bissel et al., *J. Theor. Biol.* 99:31-68, 1982; Carlson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2403-2406, 1981). Matrica veikia kaip makromolekulinis filtras (Hay, E.D., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, Plenum Press, 1982) ir taip pat veikia citodiferenciaciją, mitogenezę ir morfogenezę (Gospodarowiczs, D., *Cancer Res.* 38:4155-171, 1978). Biocheminės sąveikos tarp normalių ląstelių neoplazijos atveju gali būti pakitę ir tai gali turėti įtaką auglio proliferacijai. Auglio ląstelės gali sąveikauti su matrica įvairiais būdais. Pirma, auglio ląstelės gali prisijungti prie matricos per specifinius plazmos membranos receptorius (Terranova et al., *Cancer Res.* 42:2265-2269, 1982). Antra, matricos degradacijoje tarpininkauja fermentų kaskada, kuriuos paduoda auglio ląstelė ir šeimininkas (Eisen et al., *Biochem. Biophys. Acta* 151:637-645, 1968). Trečia, diferenciuotose auglio vietose auglio ląstelės gali sintezuoti ir sukaupti matricą arba paskatinti šeimininko ląsteles sukaupti papildomą matricą (Brownstein et al., *Cancer* 40:2979-2986, 1977).

RG1 pasižymi homologija ekstraląstelių matricinių baltymų pošeimei, koduojamai Mindin/F-spondino genų. Šią genų šeimą jungia dvi konservatyvios spondino sritys, FS1 ir FS2, netoli amino-galo ir mažiausiai vienas trombospondino tipo 1 pasikartojimas (TSR1) karboksi-gale (Shimeld, S.M., *Mol. Biol. Evol.* 15(9):1216-1223, 1998). TRS motyvas buvo iš pradžių rastas stuburinių ekstraląstelinuose matriciniuose baltymuose (Bornstein, P., *J. Cell Biol.* 130:503-506, 1995) ir po to buvo rastas keliuose kituose ekstraląstelinuose matriciniuose baltymuose. Yra keletas duomenų serijų, kad TSR tarpininkauja ląstelių sukibime ir vaidina pagrindinį vaidmenį auglių genezėje. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad trombospondino proteolitiniai fragmentai, kuriuose yra TSR ir sintetiniai peptidai, turintys sekas, atitinkančias trombospondino TSR sritį, skatina auglio ląstelių prikibimą ir metastazes (Prater et al., *J. Cell Biol.* 112:1031-1040, 1991; Tuszyński and Nicosia,

BioEssays 18:71-76, 1996), pasižymi priešangiogeniniu aktyvumu (Tolsma et al., *J. Cell Biol.* 122:497-511, 1993), inhibuoja trombocitų agregaciją ir melanomos metastazes (Tuszynski et al., *J. Cell Biol.* 116:209-217, 1992).

Neseniai į šią pošeimę buvo įtrauktas genas *Caenorhabditis elegans*, vienas genas *Drosophila* ir daug genų stuburiniuose. *C. elegans* genas F10E7.4 koduoja penkis TSR apart FS1 ir FS2 sričių (Higashijima et al., *Dev. Biol.* 192:211-227, 1997). *Drosophila* šeimos narys, pavadintas M-spondinu (mspo), turi FS1 ir FS2 sritis ir vieną TSR (Umemiya et al., *Dev. Biol.* 186:165-178, 1997). M-spondino genas koduoja sekretuojamą baltymą, kuris yra lokalizuotas raumens prijungimo vietose, ir atrodo, kad jis funkcionuoja kaip ekstraląstelinis matricinis baltymas, kuris palaiko raumens-apodermio sujungimą. Šios šeimos nariai stuburiniuose turi genus, išskirtus iš zebražuvės (Mindinas 1 ir Mindinas 2, F-spondinas 1 ir F-spondinas 2), žiurkės F-spondinas, *Xenopus* F-spondinas ir žiurkės Mindinas. Mindinas 1 ir Mindinas 2 yra artimai tarpusavyje susiję ir turi geno struktūrą, artimą *Drosophila* M-spondino struktūrai. Abu Mindinas 1 ir Mindinas 2 koduoja vieną TSR, apart FS1 ir FS2 sričių (Higashijima et al., *Dev. Biol.* 192:211-227, 1997). Zebražuvės F-spondinas 1 ir F-spondinas 2, žiurkės F-spondinas (Klar et al., *Cell* 69:95-110, 1992) ir *Xenopus* F-spondinas (Altaba et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8268-8272) genai visi turi panašias struktūras, koduojančias šešias kopijas TSR apart FS1 ir FS2 sričių. Stuburiniuose Mindino/F-spondino pošeimė gali būti išskiriama į dvi grupes: genai, kurie yra glaudžiai susiję su originaliais žiurkės F-spondino ir Mindino genais, ir genai, kurie yra glaudžiai susiję su *Drosophila* M-spondino genu. Abu stuburinių Mindino ir F-spondino genai koduoja baltymus, kuriuos pirmiausia ekspresuoja neurono vamzdelio atraminė plokštelė embrioninio vystymosi metu.

Neseniai atskiras F-spondinui giminingas genas, AmphiF-spondinas, buvo išskirtas iš amphioxus (Shimeld, S.M., *Mol. Bio. Evol.* 15(9): 1518-1223, 1998). Remiantis molekuline filogenetika, AmphiF-spondinas yra labai giminingas ypatingai stuburinių F-spondino genų pogrupei, kuri koduoja šešis TSR. AmphiF-spondinas koduoja tris TSR ir du fibronektino tipo III pasikartojimus; vienas iš jų turi stiprų identiškumą fibronektino tipo III pasikartojimui iš Deleted in Colorectal Cancer (DCC). Baltymo ekspresija

rasta per daugumą centrinių nervų sistemų ir nėra apribota vidurio linija, kaip aprašyta stuburinių Mindino ir F-spondino baltymų atveju.

Šie duomenys duoda pagrindo manyti, kad ekstraląsteliniai matriciniai baltymai, tokie kaip naujasis RG1 baltymas, kuris yra homologiškas Mindino/F-spondino pošeimei, bus geri kandidatai naudoti vėžio diagnostikoje ir terapinėje intervencijoje.

IŠRADIMO SANTRAUKA

Šiame išradime pateikiama polinukleotidų seka, kuri vienintelė koduoja naująjį baltymą, čia pavadintą RG1. RG1 polipeptidas turi homologiją su žiurkių Mindino ekstraląstelinio matriciniu baltymu. Jis turi hidrofobinę signalinę seką N-gale, dvi spondino sritis (FS1 ir FS2) ir trombospondino tipo 1 pakartojimą C-gale. RG1 turi 89,7 % panašumą į žiurkių Mindiną. Polinukleotidų seka, čia pavadinta *rg1* ir parodyta fig.1 (SEQ ID NO:1), koduoja aminorūgščių seką RG1, kuri yra parodyta fig.2 (SEQ ID NO:2).

Šia prasme ir kitomis, šio išradimo tikslas, tarp kitko, yra pateikti polipeptidus, kurie buvo identifikuoti kaip nauji baltymai, turintys homologiją ekstraląstelinio matricinių baltymų Mindino šeimai, kaip parodyta lyginant fig.2 duotą aminorūgščių seką (SEQ ID NO: 2) ir kitų ekstraląstelinio matricinių baltymų aminorūgščių sekas.

Be to, kitas šio išradimo tikslas yra pateikti polinukleotidus, kurie koduoja tokius polipeptidus, konkrečiau polinukleotidus, kurie koduoja polipeptidą, čia pavadintą RG1.

Sutinkamai su šiuo išradimo aspektu, yra pateikiami išskirti polinukleotidai, koduojantys RG1, įskaitant mRNR, kDNR ir kituose šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantuose biologiškai, diagnostiškai, kliniškai arba terapiškai naudingus variantus, analogus arba jų darinius arba jų fragmentus, įskaitant variantų, analogų ir darinių fragmentus.

Tarp ypatingai svarbių šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantų yra natūraliai atsirandantys polinukleotidų, kurie koduoja čia pažymėto RG1 polipeptido variantus, aleliniai variantai.

Sutinkamai su šiuo išradimo aspektu, yra pateikiami nauji žmogiškos kilmės polipeptidai, čia vadinami RG1, o taip pat jo biologiškai, diagnostiškai

arba terapiškai naudingi fragmentai, variantai ir dariniai, fragmentų variantai ir dariniai ir jų analogai.

Tarp ypatingai svarbių šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantų yra RG1 variantai, koduoti natūraliai atsirandančių *rg1* polinukleotidų variantų.

Dar kitas šio išradimo tikslas yra pateikti aukščiau minėtų polipeptidų, polipeptido fragmentų, variantų ir darinių, variantų ir darinių fragmentų ir jų analogų gavimo būdą. Tinkamiausiame šio išradimo aspekto įgyvendinimo variante yra pateikiami aukščiau minėtų RG1 polipeptidų gavimo būdai, apimantys auginimą šeimininko ląstelių, turinčių ekspresyškai įterptą į jį egzogeniškai išvestą RG1-koduojantį polinukleotidą, žmogaus RG1 ekspresijos sąlygomis šeimininke ir po to ekspresuoto peptido išgavimą.

Sutinkamai su kitu šio išradimo tikslu, yra pateikiami produktai, kompozicijos, procesai ir būdai, kuriuose naudojami aukščiau minėti peptidai ir polinukleotidai, tarp kitų, tyrimo, biologiniams, klinikiškiams ir terapiniams tikslams.

Sutinkamai su tam tikrais tinkamiausiais šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantais, yra pateikiami produktai, kompozicijos ir būdai, tarp kitų, RG1 ekspresijai ląstelėse įvertinti, nustatant RG1 polipeptidus arba RG1-koduojančią mRNR; ir genetinėms variacijoms ir aberacijoms, tokioms kaip defektai, *rg1* genuose įvertinti.

Sutinkamai su tam tikrais tinkamiausiais šio ir kitų išradimo aspektų įgyvendinimo variantais, yra pateikiami zondai, kurie hibridizuojasi su *rg1* sekomis.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti antikūnus, kurie yra labai atrankūs RG1 polipeptidams arba jų fragmentams ir kurie gali būti naudojami diagnostikoje ir/arba RG1 ekspresijos, kuri gali būti susijusi su prostatos vėžiu, aptikimo būde. Sutinkamai su tam tikrais tinkamiausiais šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantais, antikūnai yra pažymimi taip, kad būtų gaunamas detektuojamas signalas. Ypatingai tinkami galėtų būti antikūnai, pažymėti radioaktyvia žyme, fermentu, chromoforu arba fluoroforu.

Kitas šio išradimo tikslas yra pateikti antikūnus, kurie yra konjuguoti su terapiniu agentu įvedimui į ląsteles *in vitro*, į ląsteles *ex vivo* ir į ląsteles *in vivo* arba į daugialąstį organizmą. Šia prasme yra ypatingai tinkami terapiniai agentai, kurie yra citotoksiški. Tam tikruose šia prasme tinkamiausiuose

įgyvendinimo variantuose turėtų būti įvedami konjuguoti antikūnai pacientui-žmogui gydyti ligos būklei, kuriai yra būdingas RG1 aktyvumas arba ekspresija, tokiai kaip prostatos vėžys.

Dar kitu šio išradimo aspektu yra pateikiami peptidai ir anti-idiotipiniai antikūnai, kurie gali būti naudojami imuniniam atsakui stimuliuoti.

Dar kitu šio išradimo aspektu yra pateikiami ribozimai ir polinukleotidai, komplementarūs *rg1* polinukleotidams (t.y. antiprasminiai polinukleotidai) įvedimui [ląsteles *in vitro*, [ląsteles *ex vivo* ir [ląsteles *in vivo* arba [daugialąstį organizmą. Ypatingai tinka šia prasme įvesti antiprasmines molekules pacientui-žmogui gydyti ligos būklei, tokiai kaip prostatos vėžys arba gerybinė prostatos hiperplazija, kuri yra palengvinama sumažinant RG1 aktyvumo lygį.

Kiti šio išradimo tikslai, ypatybės, privalumai ir aspektai paaiškės specialistams iš toliau duodamo aprašymo. Vienok reikėtų suprasti, kad toliau duodamas aprašymas ir konkretūs pavyzdžiai, nurodant tinkamiausius šio išradimo įgyvendinimo variantus, yra duodami tik iliustracijai. Skaitydami toliau duodamą aprašymą ir kitas šio išradimo aprašymo dalis, specialistai turėtų suprasti, kad yra galimi įvairūs pakeitimai ir modifikacijos šio išradimo esmės ir sferos ribose.

TRUMPAS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

FIG.1: *rg1* polinukleotido seka (SEQ ID NO: 1), kuri koduoja biologiškai arba imunologiškai aktyvią RG1 formą.

FIG.2: RG1 išvesta aminorūgščių seka (SEQ ID NO: 2) su vienu brūkšniu pabrauktomis F-spondino sritimis ir dviem brūkšniais pabraukta trombospondino sritimi.

FIG.3: RG1 aminorūgščių sugretinimas su pelės Mindino seka. RG1 seka yra viršuje.

FIG.4: Polinukleotido ir RG1 išvestos aminorūgščių sekos.

FIG.5: *rg1* mRNR ekspresija žmogaus audiniuose remiantis Taqman PCR analize. RNR iš žmogaus audinių (iš auglio ir normalaus) buvo išskirtos panaudojant standartines metodikas. Pradmenys ir zondai *rg1* mRNR ekspresijai aptikti buvo suprojektuoti naudojant Perkin Elmer's Primer Express

programą ir susintezuoti Synthetic Genetics. *Rg1* mRNR buvo aptikta žmogaus prostatos audiniuose. Daug mažesnę *rg1* mRNR ekspresiją galima buvo aptikti kituose audiniuose, pvz. kepenyse.

FIG.6: Gamtinio, LNCaP ląstelių išskirto RG1 baltymo gryninimas. Western'o blotingo analizė, naudojant antiserumus, generuotus prieš sintetinę RG1 peptido seką (3C, SEQ ID NO: 10; žr. 4 pavyzdį), gamtiniam LNCaP ląstelių išskirtam RG1 baltymui aptikti. Eliuavimo frakcijos iš koncentruotos LNCaP ląstelių kondicionuotos terpės Q-sefarozės chromatografijoje: (L) kolonėlės įkrova, (F) kolonėlės perplovimas, (1-12) eliuavimo frakcijos per druskos gradientą. Laukiama RG1 molekulinė masė yra ~36 kD, tačiau buvo rasta, kad ant PAGE bakterijų ekspresuotas RG1, BHK-ekspresuotas RG1 ir LNCaP-ekspresuotas RG1 baltymai (L, 6-9 frakcijos) migravo ties ~45 kD.

FIG.7: RG1 ekspresijos žmogaus prostatos audiniuose imunohistocheminis dažymas. Prostatos audiniai buvo gauti iš Stanford University School of Medicine urologijos skyriaus. Dažymas buvo vizualizuotas Vector Rad substratų rinkiniu (SK-5100) ir kontrdažyta hematoksilinu. Rezultatai rodo stiprų periliuminalinės membranos nudažymą susidarant liaukoms.

SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Apibrėžimai

Šiame aprašyme, pavyzdžiuose ir pridedamoje apibrėžtyje, jeigu nenurodyta kitaip, toliau duodami terminai turi tokias reikšmes:

"RG1" reiškia polipeptidą, turintį aminorūgščių seką, parodytą fig.2 (SEQ ID NO: 2); jo variantus, analogus, darinius ir fragmentus ir variantų, analogų ir darinių fragmentus. Terminai "fragmentas", "darinys" ir "analogas", kalbant apie fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą, reiškia polipeptidą, kuris išlaiko iš esmės tą patį biologinį ir/arba imunologinį aktyvumą, kaip ir fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidas.

"*rg1*" reiškia polinukleotidą, turintį seką, parodytą fig.1 (SEQ ID NO: 1) ir polinukleotidus, koduojančius polipeptidus, turinčius RG1 aminorūgščių seką, parodytą fig.2 (SEQ ID NO: 2); ir polinukleotidus, koduojančius RG1

variantus, analogus, darinius ir fragmentus bei variantų, analogų ir darinių fragmentus. *Rg1* taip pat reiškia tokius iš RNR sudarytus polinukleotidus bei polinukleotidus, kurie yra polinukleotidų, koduojančių fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą polipeptido seką, komplementai.

"Polinukleotidas(ai)" paprastai reiškia bet kokią poliribonukleotidą arba polidezoksiribonukleotidą, kuris gali būti nemodifikuotos RNR arba DNR arba modifikuotos RNR arba DNR. Taigi, pavyzdžiui, polinukleotidai, kaip čia naudojama, tarp kitų, reiškia viengrandinę ir dvigrandinę DNR ir DNR, kuri yra viengrandinių ir dvigrandinių sričių mišinys, viengrandinę ir dvigrandinę RNR ir RNR, kuri yra viengrandinių ir dvigrandinių sričių mišinys, hibridines molekules, turinčias DNR ir RNR, kurios gali būti viengrandinės arba, dažniau, dvigrandinės, arba viengrandinių ir dvigrandinių sričių mišinys. Be to, polinukleotidas, kaip čia naudojama, reiškia trigrandines sritis, turinčias RNR arba DNR arba ir RNR, ir DNR. Grandinės tokiose srityse gali būti iš tos pačios molekulės arba iš skirtingų molekulių. Šios sritys gali apimti visą vieną arba daugiau molekulių, bet dažniau jos apima tik kai kurių molekulių sritį. Viena iš trigubai spiralinės srities molekulių dažniausiai yra oligonukleotidas.

Čia naudojamas terminas "polinukleotidas" apima aukščiau aprašytas DNR ir RNR, kurios turi vieną arba daugiau modifikuotų bazių. Taigi, DNR arba RNR, turinčios dėl stabilumo arba kitokių priežasčių modifikuotą karkasą, čia yra laikomos "polinukleotidais". Be to, DNR arba RNR, turinčios neįprastas bazes, tokias kaip inozinas, arba modifikuotas bazes, tokias kaip tričių žymėtos bazės, paminint tik šiuos du pavyzdžius, čia yra laikomos polinukleotidais.

Turėtų būti suprantama, kad DNR ir RNR buvo padaryta daugybė modifikacijų, kurios tarnauja daugeliui specialistams žinomų naudingų tikslų. Čia naudojamas terminas "polinukleotidas" apima tokias chemiškai, fermentiškai arba metaboliškai modifikuotas polinukleotidų formas, o taip pat chemines DNR ir RNR formas, būdingas virusams ir ląstelėms, tarp kitų, įskaitant paprastas ir sudėtingas ląsteles.

Čia naudojamas terminas "polipeptidai" apima visus toliau aprašytus polipeptidus. Pagrindinė polipeptidų struktūra yra gerai žinoma ir buvo aprašyta nesuskaičiuojamoje daugybėje vadovėlių ir kitų šios srities

publikacijų. Šiame kontekste čia naudojamas terminas reiškia bet kokį peptidą arba baltymą, turintį dvi arba daugiau aminorūgščių, sujungtų viena su kita linijinėje grandinėje peptidiniais ryšiais. Kaip čia naudojama, šis terminas reiškia ir trumpas grandines, kurios paprastai yra priimta vadinti, pavyzdžiui, peptidais, oligopeptidais ir oligomerais, ir ligesnes grandines, kurios paprastai yra vadinamos baltymais, kurių yra daugybė tipų.

Turėtų būti suprantama, kad polipeptiduose dažnai yra aminorūgščių, kitokių nei 20 aminorūgščių, paprastai vadinamų 20 gamtinių aminorūgščių, ir kad daug aminorūgščių, įskaitant galines aminorūgštis, duotame polipeptide gali būti modifikuotos arba dėl gamtinių procesų, tokių kaip glikozilinimas ir kitos potrasliacinės modifikacijos, arba cheminiais modifikavimo būdais, kurie yra gerai žinomi. Netgi įprastos modifikacijos, kurios įvyksta natūraliai polipeptiduose, yra per daug skaitlingos, kad būtų galima čia jas išvardinti, bet jos yra gerai aprašytos pagrindiniuose tekstuose ir labiau detalizuotose monografijose, o taip pat gausioje mokslinėje literatūroje, ir jos specialistams yra gerai žinomos. Tarp žinomų modifikacijų, kurios gali būti šio išradimo peptiduose, iliustracijai paminint keletą iš jų, yra acetilinimas, acilinimas, ADP-ribozilinimas, amidinimas, kovalentinis flavino prijungimas, kovalentinis hemo liekanos prijungimas, kovalentinis polinukleotido arba polinukleotido darinio prijungimas, kovalentinis lipido arba lipido darinio prijungimas, kovalentinis fosfatidilinozitolio prijungimas, skersinių ryšių sudarymas, ciklizacija, disulfidinio ryšio sudarymas, demetilinimas, kovalentinio skersinio ryšio sudarymas, cistino sudarymas, pirogliutamato sudarymas, formilininimas, gama-karboksilinimas, glikacija, glikozilinimas, GPI inkaro sudarymas, hidroksilinimas, jodinimas, metilininimas, miristoilininimas, oksidininimas, proteolitinis apdorojimas, fosforilininimas, prenilininimas, racemizacija, selenoilininimas, sulfatacija, pernešimo-DNR tarpininkaujamas aminorūgščių prijungimas prie baltymų, kaip antai arginilininimas ir ubikvitinizacija.

Tokios modifikacijos specialistams yra gerai žinomos ir jos buvo labai smulkiai aprašytos mokslinėje literatūroje. Keletas ypatingai įprastų modifikacijų, pavyzdžiui, glikozilinimas, lipidų prijungimas, sulfatacija, glutamo rūgšties liekanų gama-karboksilinimas, hidroksilinimas ir ADP-ribozilinimas, yra aprašytos pagrindiniuose tekstuose, kaip pavyzdžiui, I.E. Creighton, *Proteins – Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W.H. Freeman and

Company, New York, 1993. Šiuo klausimu yra daug detalių apžvalgų, tokių kaip, pavyzdžiui, apžvalgos, pateiktos Wold, F., in *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp.1-12, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 ir Rattan et al.; *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

Turėtų būti suprantama, tai yra gerai žinoma ir pažymėta aukščiau, polipeptidai nevisada yra linijiniai. Pavyzdžiui, polipeptidai gali būti šakoti dėl ubikvitinizacijos, ir jie gali būti žiediniai su arba be atsišakojimų, paprastai dėl potransliacinių procesų, įskaitant natūraliai vykstančius procesus ir procesus, kuriuos sukelia žmogaus manipuliacijos, kurios gamtoje nevyksta. Žiediniai, šakoti ir šakotai žiediniai polipeptidai gali būti sintezuojami panaudojant netransliacinius gamtinius procesus, o taip pat ir grynai sintetiniais metodais.

Modifikacijos polipeptide gali atsirasti bet kur, įskaitant peptido karkasą, aminorūgščių šonines grandines ir amino- arba karboksi-galus. Faktiškai, amino- arba karboksigrupių blokavimas yra įprastas ir gamtiniuose ir sintetiniuose polipeptiduose, ir tokios modifikacijos gali būti šio išradimo polipeptiduose taip pat. Pavyzdžiui, *E. coli* pagamintų polipeptidų amino-galo liekana, prieš proteolitinį apdorojimą, beveik visada bus N-formilmetioninas.

Polipeptide atsirandančios modifikacijos dažnai yra jo pagaminimo būdo funkcija. Pavyzdžiui, polipeptidams, gaunamiems ekspresuojant klonuotą geną šeimininke, modifikacijų prigimtis ir laipsnis didžiąja dalimi bus apspręstas šeimininko ląstelių potransliacinės modifikacijos gebos ir modifikacijos signalų, esančių polipeptidinėje aminorūgščių sekoje. Pavyzdžiui, kas yra gerai žinoma, glikozilinimas dažnai nevyksta bakteriniuose šeimininkuose, tokiuose kaip *E. coli*. Taigi, jeigu yra pageidaujamas glikozilinimas, polipeptidas turi būti ekspresuojamas glikozilinančiame šeimininke, paprastai eukariotinėje ląstelėje. Vabzdžių ląstelėse dažnai vykdomas toks pats potransliacinis glikozilinimas kaip ir žinduolių ląstelėse ir dėl šios priežasties buvo ištobulintos vabzdžių ląstelių ekspresijos sistemos, kad jos efektyviai ekspresuotų žinduolių baltymus, tarp kitų dalykų, turinčius natyvų glikozilinimo vaizdą. Panašūs svarstymai tinka ir kitoms modifikacijoms.

Turėtų būti suprantama, kad tas pats modifikacijos tipas gali būti tokiu pačiu arba kintančiais laipsniais keliose duoto polipeptido vietose. Be to, duotas polipeptidas gali turėti daug modifikacijų tipų.

Bendrai paėmus, čia naudojamas terminas polipeptidas apima visas tokias modifikacijas, ypač tokias, kurios yra polipeptiduose, sintezuotuose ekspresuojant polinukleotidą šeimininko ląstelėje.

Čia naudojamas terminas "polinukleotidas, koduojantis polipeptidą" apima polinukleotidus, kuriuose yra seka, koduojanti šio išradimo polipeptidą, ypač RG1 polipeptidą, turintį fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką. Šis terminas apima polinukleotidus, kuriuose yra viena nepertruakiama sritis arba pertrauktos sritys, koduojančios šį polipeptidą (pavyzdžiui, pertrauktos intronais) kartu su papildomomis sritimis.

"Biologinis aktyvumas" reiškia gamtinio RG1 polipeptido struktūrinę, reguliacinę arba biocheminę funkcijas.

"Imunologinis aktyvumas" reiškia gamtinio, rekombinantinio arba sintetinio RG1 arba jo fragmento gebą indukuoti specifinį imuninį atsaką tam tikruose gyvūnuose arba ląstelėse ir susirišti su specifiniais antikūnais.

"Oligonukleotidas(ai)" reiškia santykinai trumpus polinukleotidus. Dažnai šis terminas reiškia palyginus trumpus polinukleotidus. Dažnai šis terminas reiškia viengrandinius dezoksiribonukleotidus, bet taip pat jis gali reikšti viengrandinius arba dvigrandinius ribonukleotidus, RNR:DNR hibridus ir, tarp kitų, dvigrandines DNR. Oligonukleotidai, tokie kaip viengrandiniai DNR zondų oligonukleotidai, dažnai yra sintezuojami cheminiais būdais, tokiais kaip įrengti automatizuotuose oligonukleotidų sitezatoriuose. Tačiau oligonukleotidai gali būti pagaminami įvairiais kitais būdais, įskaitant *in vitro* rekombinantinius DNR tarpininkaujamus metodus ir DNR ekspresiją ląstelėse ir organizmuose. "Oligonukleotidai" arba "oligomerai", arba polinukleotidų "fragmentas", "dalis" arba "segmentas" reiškia polinukleotido seką iš mažiausiai apie 10 nukleotidų ir daugiausiai iš apie 60 nukleotidų, geriau maždaug iš 15-30 nukleotidų, o dar geriau maždaug iš 20-25 nukleotidų.

"Natūraliai atsirandantis RG1" reiškia žmogaus ląstelių produkuotą RG1, kuris nebuvo gautas genų inžinerijos būdu, ir ypač yra turima omenyje įvairios RG1 formos, atsirandančios iš polipeptido potransliacinių

modifikacijų, įskaitant, bet neapsiribojant, acetilinimą, karboksilinimą, glikozilinimą, fosforilinimą, lipidizaciją, acilinimą ir skaldymą.

Čia naudojamas terminas polinukleotidų arba polipeptidų "variantas(ai)" reiškia polinukleotidus arba polipeptidus, kurie skiriasi atitinkamai nuo etaloninio polinukleotido arba polipeptido. Šia prasme variantai išradimo aprašyme detaliau yra aprašyti toliau ir kitur.

(1) Polinukleotidas, kuris skiriasi polinukleotidų seka nuo kito, etaloninio polinukleotido. Paprastai skirtumai yra apriboti taip, kad etaloninio polinukleotido ir varianto sekos yra visumoje labai panašios, o daugelyje sričių yra identiškios.

Kaip pažymėta toliau, pokyčiai polinukleotido sekoje gali būti neveiksmingi. Tai yra jie gali nepakeisti polinukleotido koduojamų aminorūgščių. Kai pokyčiai yra apriboti šio tipo neveiksmingais pakeitimais, variantas koduos tos pačios aminorūgščių sekos, kaip ir etalono, polipeptidą. Taip pat kaip pažymėta toliau, pakeitimai varianto polinukleotido sekoje gali pakeisti polipeptido, kuris buvo koduotas etaloninio polinukleotido, aminorūgščių seką. Tokie polinukleotido pakeitimai gali duoti aminorūgščių pakeitimą, pridėjimą, deleciją, suliejimą ir nukirpimą polipeptido, kuris buvo koduotas etaloninio polinukleotido, sekoje, kas aptariama toliau.

(2) Polipeptidas, kuris skiriasi aminorūgščių seka, nuo kito, etaloninio polipeptido. Bendrai imant, skirtumai yra apriboti tuo, kad etalono ir varianto sekos yra visumoje labai panašios ir daugelyje sričių yra identiškios. Variantas ir etaloninis polipeptidas gali skirtis aminorūgščių sekoje vienu arba daugiau pakeitimų, pridėjimų, delecijų, suliejimų ir nukirpimų, kurie gali būti įvairiais deriniais. Rekombinantiniai variantai, koduojantys tokius pačius arba panašius polipeptidus, gali būti sintezuojami arba pasirinkti naudojant "perteklių" genetiniame kode. Gali būti įvesti įvairūs kodono pakeitimai, tokie kaip neveiksmingi pokyčiai, kurie duoda įvairias restrikcijos vietas, norint optimizuoti įklonavimą į plazmidę arba virusinį vektorių, arba ekspresiją konkrečioje prokariotinėje arba eukariotinėje sistemoje. Mutacijos taip pat gali būti įvestos, norint modifikuoti polipeptido savybes, pakeisti ligando surišimo afiniškumą, tarpgrandininį afiniškumą arba polipeptido degradaciją arba virsmo dažnį.

“Alelinis variantas” reiškia alternatyvią *rg1* polinukleotido formą. Alelės atsiranda dėl mutacijų, t.y. pokyčių nukleotido sekoje, ir paprastai duoda pakeistas mRNR arba polipeptidus, kurių struktūra arba funkcija gali būti pakeista arba nepakeista. Bet kuris duotas genas gali neturėti alelinių formų arba gali turėti vieną arba daug alelinių formų. Yprasti mutaciniai pokyčiai, kurie duoda aleles, yra paprastai priskiriami gamtinėms nukleotidų delecijoms, pridėjimams arba pakeitimams. Kiekvienas iš šių pokyčių tipų gali atsirasti vienas arba derinyje su kitais, arba vieną arba daugiau kartų duotoje sekoje.

“Derinys” reiškia polinukleotidus arba polipeptidus, išvestus iš atitinkamai gamtinio *rg1* arba RG1, panaudojant cheminę modifikaciją, tokią kaip ubikvitinizacija, žymėjimą (pvz. radionuklidais, įvairias fermentines modifikacijas), pegilinimą (derivatizaciją polietilenglikoliu) arba įterpiant arba pakeičiant aminorūgštis, tokias kaip ornitiną (arba pakeičiant nukleotidus, kurie koduoja tokią aminorūgštį), kurių paprastai nebūna žmogaus baltymuose.

“Delecija” paprastai apibūdinama kaip pakeitimas arba polinukleotide arba aminorūgščių sekoje, kur atitinkamai nėra vieno arba daugiau polinukleotidų arba aminorūgščių liekanų.

“Įterpimas” arba “pridėjimas” yra pakeitimas polinukleotide arba aminorūgščių sekoje, kurį duoda atitinkamai vieno arba daugiau polinukleotidų arba aminorūgščių liekanų pridėjimas, lyginant su gamtiniu polinukleotidu arba aminorūgščių seka.

“Pakeitimas” gaunamas pakeitus vieną arba daugiau polinukleotidų arba aminorūgščių atitinkamai kitais polinukleotidais arba aminorūgštimis.

Geriau, kad aminorūgščių pakeitimai būtų vienos aminorūgšties pakeitimas kita panašią struktūrą ir/arba chemines savybes turinčia aminorūgštimi, tokie kaip leucino pakeitimas izoleucinu arba valinu, aspartato pakeitimas glutamatu arba treonino pakeitimas serinu, t.y. konservatyvusis aminorūgšties pakeitimas. Įterpimai arba delecijos yra paprastai nuo maždaug 1 iki 5 aminorūgščių eilės. Leidžiamos variacijos gali būti eksperimentiškai nustatomos sistemiškai darant aminorūgščių įterpimus, delecijas arba pakeitimus polipeptide, naudojant rekombinantines DNR metodikas ir gautų rekombinantinių variantų aktyvumą.

"Fragmentas" yra polipeptidas, turintis aminorūgščių seką, kuri ištiesai yra ta pati kaip ir dalis, bet ne visa aukščiau minėtų RG1 polipeptidų ir jų variantų arba darinių aminorūgščių seka.

Polipeptido "fragmentas", "dalis" arba "segmentas" yra aminorūgščių liekanų seka iš mažiausiai maždaug 5 aminorūgščių, dažnai mažiausiai 7 aminorūgščių, paprastai mažiausiai iš 9-13 aminorūgščių, o įvairiuose įgyvendinimo variantuose iš mažiausiai maždaug 17 arba daugiau aminorūgščių.

"Rekombinantas" arba "rekombinantinė DNR molekulė" reiškia polinukleotido seką, kuri nėra atsiradusi gamtoje, arba yra padaryta dirbtiniu būdu derinant du kitais atžvilgiais atskirus sekos segmentus. "Rekombinantiniu būdu gautas" reiškia dirbtinį derinį, dažnai pagamintą arba cheminės sintezės būdais, arba dirbtinai manipuluojant su išskirtais polinukleotidų segmentais, t.y. genų inžinerijos metodais. Tokios manipuliacijos yra paprastai atliekamos, norint pakeisti kodoną pertekliniu kodonu, koduojančiu tą pačią arba konservatyvią aminorūgštį, paprastai įvedant arba pašalinant sekos atpažinimo vietą. Kitu atveju, tai atliekama norint sujungti į vieną polinukleotido segmentus su norimomis funkcijomis ir generuoti vieną genetinį vienetą, turintį norimą funkcijų derinį, nerandamą įprastose gamtinėse formose. Pagal numatytą planą gali būti įterpiamos fermentų restrikcijos vietos, reguliacinės sekos, kontrolinės sekos arba kitokios naudingos ypatybės. Į "rekombinantines DNR molekules" įeina klonavimo ir ekspresijos vektoriai. "Rekombinantas" taip pat gali reikšti polinukleotidą, kuris koduoja polipeptidą ir yra pagamintas naudojant rekombinantinius DNR metodus.

"Išskirtas" reiškia pakeistas "žmogaus rankomis" iš jo natūralios būklės; t.y., jeigu jis atsiranda gamtoje, tai jis buvo pakeistas arba išimtas iš pradinės aplinkos, arba ir pakeistas, ir išimtas. Pavyzdžiui, natūraliai susidarantis polinukleotidas arba polipeptidas, paprastai esantis gyvame gyvūne jo natūralioje būklėje nėra "išskirtas", bet tas pats polinukleotidas arba polipeptidas, atskirtas nuo jo natūralioje būklėje kartu esančių medžiagų, yra "išskirtas", kaip čia yra priimta vadinti. Pavyzdžiui, kalbant apie polinukleotidus, terminas "išskirtas" reiškia, kad jis yra atskirtas nuo chromosomos ir ląstelės, kurioje jis paprastai atsiranda.

Polinukleotidai ir polipeptidai gali atsirasti derinyje, tokiame kaip terpės kompozicijos, tirpalai polinukleotidams arba polipeptidams įvesti, pavyzdžiui, į ląsteles, kompozicijos arba tirpalai, pavyzdžiui, cheminėms arba fermentinėms reakcijoms, kurios nėra gamtinės kompozicijos ir čia išlieka išskirti polinukleotidai arba polipeptidai čia naudojamo termino prasme.

„Iš esmės grynas“ ir „iš esmės homogeninis“ yra naudojami pakaitomis ir aprašo RG1 polipeptidą arba jo fragmentus arba jį koduojantį polinukleotido segmentą, kur toks polipeptidas arba polinukleotidas yra atskirtas nuo jį natūraliai lydinčių komponentų. RG1 polipeptidas arba jo fragmentas, arba jį koduojantis DNR segmentas iš esmės neturi natūraliai su juo susijusių komponentų, kai jis atskiriamas nuo gamtinių priemaišų, kurios jį lydi natūralioje būklėje. Taigi, polipeptidas, kuris yra chemiškai sintezuotas arba sintezuotas ląstelių sistemoje, skirtingoje nuo ląstelės, kurioje jis paprastai atsiranda, bus iš esmės laisvas nuo jo natūraliai su juo susijusių komponentų. Panašiu būdu, polinukleotidas, kuris yra chemiškai sintezuotas arba sintezuotas ląstelių sistemoje, skirtingoje nuo ląstelės, kurioje jis paprastai atsiranda, bus iš esmės laisvas nuo jo natūraliai su juo susijusių komponentų.

Terminas „homologiškas“, kai jis yra naudojamas polinukleotidui aprašyti, rodo, kad du polinukleotidai arba jų suprojektuotos sekos, kai jos yra optimaliai išdėstytos ir sulygintos, yra identiškos, su tinkamais nukleotidų tarpais arba delecijomis, bent jau 70 % nukleotidų, paprastai nuo maždaug 78 % iki 99 %, o dar geriau bent jau 98-99 % nukleotidų.

Terminas „panašumas“, kai jis yra naudojamas polipeptidui aprašyti, yra nustatomas, lyginant vieno polipeptido aminorūgščių seką ir konservatyviųjų aminorūgščių pakeitimus su antrojo polipeptido seka.

„Polimerazinė grandinės sintezė“ arba „PCR“ reiškia procedūrą, kurioje yra dauginami specifiniai DNR gabalai kaip aprašyta JAV patente Nr. 4,683,195, paskelbtame 1987 m. liepos 28 d. Bendrai imant, sekos informacija nuo dominančio polipeptidinio fragmento galų arba po jų turi būti prieinama, kad būtų galima projektuoti oligonukleotidinius pradmenis; šie pradmenys bus nukreipti vienas į kitą ir bus vienodos arba panašios sekos į priešingas gausinamos matricos grandines. Abiejų pradmenų 5-galo nukleotidai sutaps su gausinamos medžiagos galais. PCR gali būti naudojama specifinėms DNR sekoms iš bendros genomines DNR gausinti,

kDNR nurašyti nuo bendros ląstelinės RNR, plazmidžių sekoms ir t.t. (Žr. pagrindinai Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263, 1987; Erlich, ed., *PCR Technology*, Stockton Press, NY, 1989).

"Suvaržymas" paprastai atsiranda intervale nuo maždaug T_m (lydymosi temperatūra) - 5 °C (5° žemiau mėginio T_m) iki maždaug 20 °C-25 °C žemiau T_m . Specialistams bus aišku, kad suvaržyta hibridizacija gali būti naudojama identiškoms polinukleotidų sekoms identifikuoti arba aptikti arba panašioms arba giminingoms polinukleotidų sekoms identifikuoti arba aptikti. Čia naudojamas terminas "griežtos sąlygos" reiškia, kad hibridizacija įvyks tik tada, jei bus mažiausiai 95 %, geriau mažiausiai 97 %, identiškumo tarp sekų.

Čia naudojamas terminas "hibridizacija" apims "bet kokį procesą, kuriame polinukleotido grandinė susijungs su komplementaria grandine per bazių susiporavimą" (Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, New York, N.Y., 1994).

"Terapiškai efektyvus kiekis" reiškia tokį peptido arba jo antikūnų, antagonistų arba inhibitorių, įskaitant antiprasmines molekules ir ribozimus, kiekį, kuris pagerina ligos simptomus arba būklę. Tokių junginių terapinis efektyvumas ir toksiškumas gali būti nustatomas panaudojant standartines farmacinės metodikas ląstelių kultūrose arba eksperimentinius gyvūnus, pvz. ED_{50} (terapiškai efektyvi dozė 50 % populiacijos) ir LD_{50} (letalinė dozė 50 % populiacijos). Dozių santykis tarp terapinių ir toksinių efektų yra terapinis indeksas, ir jis gali būti išreiškiamas santykiu ED_{50}/LD_{50} .

Čia naudojamas terminas "gydant" arba "gydymas" apima paciento-žmogaus ligos būklės gydymą, kuriame ligos būklė yra susijusi su prostatos auglio augimu ir apima gydymo reikalingo paciento ligos būklės, kur reikia sumažinti RG1 kiekius.

Smulkus išradimo aprašymas

Šis išradimas, tarp kitų dalykų, yra susijęs su naujais RG1 polipeptidais, *rg1* polinukleotidais ir antikūnais prieš RG1 polipeptidus, kas smulkiau yra aprašyta toliau. Konkrečiau šis išradimas yra susijęs su naujais RG1 polipeptidais ir šiuos RG1 polipeptidus koduojančiais polinukleotidais ir ypačingai yra susijęs su RG1, turinčiu fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, ir *rg1*, turinčiu fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytą

polinukleotido seką. Šis išradimas taip pat apima RG1 variantus. Tinkamiausias RG1 variantas yra toks, kuris turi mažiausiai 70 % panašumą (geriau mažiausiai 70 % identiškumą) fig.2 (SEQ ID NO:2) parodytai polipeptido sekai, geriau mažiausiai 90 % panašumą (geriau mažiausiai 90 % identiškumą) fig.2 (SEQ ID NO:2) parodytai polipeptido sekai, o dar geriau mažiausiai 95 % panašumą (dar geriau mažiausiai 95 % identiškumą) fig.2 (SEQ ID NO:2) parodytai polipeptido sekai, ir taip pat apima tokių peptidų dalis, turinčias paprastai bent 30 aminorūgščių, geriau bent 50 aminorūgščių.

Koduojanti seka suprojektuotam RG1 polipeptidui prasideda nuo 296 bazių porų iš fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytos nukleotidų sekos 5'-galo. RG1 turi tris struktūrines sritis, būdingas ekstraląstelių matricinių baltymų Mindino/F-spondino pošeimei: dvi spondino sritis (FS1 ir FS2), apimančias atitinkamai aminorūgštis 31-103 ir 138-221, ir trombospondino sritį, apimančią aminorūgštis 278-330.

Šis išradimas dalinai yra paremtas fig.3 parodyta struktūrine homologija tarp RG1 ir žiurkės Mindino – kito ekstraląstelių matricinių baltymų šeimos nario. RG1 aminorūgščių seka yra maždaug 89,7 % panaši į žiurkės Mindiną.

Šis išradimas taip pat yra dalinai paremtas RG1 ekspresijos vaizdu, kaip rodo jo ekspresija prostatos audinių bibliotekose ir perekspresija prostatos auglio bibliotekose. Šis audinių vaizdas yra matomas analizuojant mRNR ekspresiją audinių mėginiuose iš normalių ir auglio audinių PCR paremtoje Taqman'o analizėje. Šis analizės būdas parodė, kad RG1 koduojanti mRNR yra perekspresuojama prostatos audiniuose, lyginant su kitais audiniais.

Polinukleotidai

Pagal vieną šio išradimo aspektą yra pateikiami išskirti polinukleotidai, kurie koduoja RG1 polipeptidą, turintį išvestą fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką.

Naudojant čia pateiktą informaciją, tokią kaip fig.1 (SEQ ID NO: 1) pateikta polinukleotido seka, šio išradimo RG1 polipeptidą koduojantis polinukleotidas gali būti gaunamas naudojant standartines klonavimo ir atrinkimo metodikas, tokias kaip kDNR klonavimą pradine medžiaga

naudojant mRNR iš žmogaus audinio ląstelių. Iliustruojant šį išradimą, fig.1 (SEQ ID NO: 1) pateikta polinukleotido seka buvo rasta kDNR klonuose, gautuose iš žmogaus prostatos audinių. *Rg1* buvo identifikuotas kaip prostatoje ekspresuotas genas, studijuojant Incyte LifeSeq duomenų bazę. Ši nukleotidų seka buvo identifikuota ieškant pagal anotaciją duomenų bazėje, naudojant Incyte pateikiamą sąvoką "baltymų funkcija" paieškos duomenų bazėje tikslams. Ši nukleotidų seka buvo rasta ląstelių adhezijos molekulių kategorijoje anotuotoje duomenų bazėje ir buvo aprašyta kaip f-spondino homologas. *Rg1* polinukleotido sekų pasiskirstymo duomenų bazės bibliotekų rinkinyje elektroninė Northern'o analizė parodė, kad *rg1* ekspresuojamas dideliais kiekiais prostatos bibliotekose ir dideliais kiekiais eilėje kitų audinių bibliotekų, įskaitant bibliotekas iš normalių ir auglio audinių.

Surinkus duomenų bazės *rg1* klonų rinkinį į gretimą polinukleotido sekas ir suredagavus gretimą seką, buvo identifikuota pilno ilgio koduojanti seka numatytoje surinktame polinukleotide. Ši seka koduoja baltymą, homologišką žiurkės mindinui.

Eksperimentiniam darbui buvo gauti Incyte klonai 1640796, 1712252 ir 1880265 iš Incyte, o 3360733 klonas buvo identifikuotas kaip turintis daugiausia 5'-nukleotidų sekas. Šis klonas buvo pilnai sekvenuotas ir turėjo pilną kodavimo seką numatytam RG1 baltymui. Ši seka yra parodyta fig.1 (SEQ ID NO: 1).

Šio išradimo polinukleotidai gali būti RNR formos, tokios kaip mRNR, arba DNR formos, įskaitant, pavyzdžiui, kDNR ir genomine DNR, gautą klonuojant arba pagaminant cheminės sintezės būdais arba derinat abu metodus, arba čia aprašytais būdais. DNR gali būti dvigrandininė arba viengrandininė. Viengrandininė DNR gali būti koduojanti grandinė, taip pat žinoma kaip prasminė grandinė, arba ji gali būti nekoduojanti grandinė, taip pat vadinama antiprasmine grandine.

Šį polipeptidą koduojanti seka gali būti identiška fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytai polinukleotido koduojančiai sekai. Ji taip pat gali būti skirtingą seką turintis polinukleotidas, kuris dėl genetinio kodo griežtumo (išsigimimo) koduoja fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą.

Šio išradimo polinukleotidai, kurie koduoja fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą, gali apimti, bet jais neapsiribojama, paties polipeptido

koduojančią seką; polipeptido koduojančią seką kartu su papildomomis nekoduojančiomis sekomis, įskaitant, pavyzdžiui, bet neapsiribojant, intronus ir nekoduojančias 5- ir 3-sekas, tokias kaip transkribuotos, netransliuotos sekos, kurios vaidina vaidmenį transkripcijoje, mRNR procesingė (pavyzdžiui, sukirpimo ir poliadenilinio signaluose), arba papildomos koduojančios sekos, kurios koduoja papildomas aminorūgštis, tokias, kaip duodančias papildomas funkcines grupes. Taigi, pavyzdžiui, peptidas gali būti sulietas su markerio seka, tokia kaip peptidas, kuris palengvina sulieto peptido išgryninimą. Tam tikruose tinkamiausiuose šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantuose markerio seka yra hekso-histidininis peptidas, toks kaip, tarp kitų, tag, pateiktas pTrcHisB vektoriuje (Invitrogen, Carlsbad, CA); dauguma jų yra prekyboje. Kaip aprašė, pavyzdžiui, Gentz et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, 1989), hekso-histidinas suteikia galimybę patogiai išgryninti sulietą baltymą.

Polinukleotidas gali koduoti polipeptidą, kuris yra polipeptidas plius papildomos aminorūgštys amino- arba karboksi-gale arba aminorūgštys polipeptido viduryje (kai, pavyzdžiui, veikli forma turi daugiau nei vieną polipeptidinę grandinę). Tokios sekos gali vaidinti vaidmenį polipeptido brendime iš pirmtako į galinę formą, gali palengvinti polipeptido judėjimą, gali pailginti arba sutrumpinti polipeptido puslaidį arba, tarp kitų dalykų, palengvinti polipeptido naudojimą testams arba jo gavimą. Kaip paprastai *in situ*, papildomos aminorūgštys gali būti atskeliamos nuo peptido panaudojant proteolitinius fermentus.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su čia aprašytų polinukleotidų variantais, kurie koduoja polipeptido, turinčio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, fragmentus, analogus ir darinius. Polipeptido variantas gali būti natūraliai atsirandantis variantas, toks kaip natūraliai susidarantis alelinis variantas, arba jis gali būti gamtoje nežinomas variantas. Tokie nenatūraliai gaunami polinukleotido variantai gali būti pagaminami panaudojant mutagenezės metodus, įskaitant metodus, kurie yra taikomi polinukleotidams, ląstelėms ir organizmams.

Šia prasme tarp variantų yra variantai, kurie skiriasi nuo aukščiau minėtų polinukleotidų polinukleotidų pakeitimais, delecijomis arba pridėjimais. Pakeitimai, delecijos arba pridėjimai gali apimti vieną arba daugiau

poilnukleotidų. Variantai gali būti pakeisti koduojančiose arba nekoduojančiose srityse, arba abiejose šitose srityse. Pakeitimai koduojančiose srityse gali duoti konservatyviųjų arba nekonservatyviųjų aminorūgščių pakeitimus, delecijas arba pridėjimus.

Tarp ypatingai tinkamų šio išradimo įgyvendinimo variantų šia prasme yra polinukleotidai, koduojantys polipeptidus, turinčius fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą RG1 polipeptido aminorūgščių seką, kurioje keletas, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 arba nei vienos aminorūgščių liekanos yra pakeistos, išimtos arba pridėtos bet koku deriniu. Ypatingai pageidautini yra neveiksmingi pakeitimai, pridėjimai ir delecijos, kurie nepakeičia RG1 polipeptido savybių ir aktyvumo. Be to, ypatingai tinkami šia prasme yra konservatyvūs pakeitimai. Labiausiai tinkami yra polinukleotidai, koduojantys polipeptidus, turinčius fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, be pakeitimų.

Kiti tinkami šio išradimo įgyvendinimo variantai yra polinukleotidai, kurie yra bent 70 % identiškai polinukleotidui, koduojančiam RG1 polipeptidą, turintį fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, ir polinukleotidai, kurie yra komplementarūs tokiems polinukleotidams. Kitu atveju, labai tinkami yra polinukleotidai, kurie apima sritį, kuri yra bent 80 % identiška polinukleotidui, koduojančiam RG1 polipeptidą, ir jiems komplementarūs polinukleotidai. Šia prasme yra ypatingai tinkami polinukleotidai bent 90 % identiškai pirmajam, o iš jų yra dar tinkamesni tie, kurie yra bent 95 % identiškai. Be to, iš jų su 97 % identiškumu yra labai pageidautini, o tarp jų su bent 98 % identiškumu yra dar labiau pageidautini, o bent 99 % identiškumo yra nepaprastai pageidautini.

Be to, šia prasme ypatingai pageidautinas įgyvendinimo variantas yra polinukleotidai, kurie koduoja polipeptidus, kurie išlaiko iš esmės tą patį biologinį aktyvumą, kaip ir polipeptidas, kurį koduoja polinukleotidas, turintis fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytą polinukleotido seką.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su polinukleotidais, kurie hibridizuojasi su čia aukščiau aprašytais sekomis. Šia prasme šis išradimas yra ypatingai susijęs su polinukleotidais, kurie hibridizuojasi griežtomis sąlygomis su čia aukščiau aprašytais polinukleotidais.

Kaip čia jau buvo aptarta, nagrinėjant šio išradimo polinukleotidų testavimą, pavyzdžiui, aukščiau aprašyti šio išradimo polinukleotidai gali būti

naudojami hibridizacijos zondais kDNR ir genominės DNR pilno ilgio kDNR bei genominių klonų, koduojančių RG1, išskyrimui ir kitų genų, kurie turi labai panašias į *rg1* geną sekas, kDNR ir genominių klonų išskyrimui. Tokie zondai paprastai turės bent jau 15 bazių. Tinkamiausia, kad tokie zondai turėtų bent 30 bazių ir gali turėti bent 50 bazių.

Pavyzdžiui, koduojanti *rg1* geno sritis gali būti išskirta atrenkant bibliotekas, naudojant sintetinius oligonukleotidinius zondus, kurie buvo skirti naudoti žinomai DNR sekai. Pavyzdžiui, žymėtas oligonukleotidas, turintis seką, komplementarią šio išradimo polinukleotido sekai, gali būti naudojamas atrinkti kDNR bibliotekai arba genominei DNR bibliotekai, norint identifikuoti klonus, kurie hibridizuojasi su zonu.

Susumuojant galima pasakyti, kad šio išradimo polinukleotidas gali koduoti polipeptidą, polipeptidą plius lyderinę seką (kuris gali būti pavadinta kaip prepolipeptidas).

Reikėtų suprasti, kad šis išradimas, tarp kitų dalykų, taip pat yra susijęs su polinukleotidais, koduojančiais polipeptido fragmentus, ypač tokiais, kurie hibridizuojasi su polinukleotidais, koduojančiais polipeptido fragmentus, ypač tokiais, kurie hibridizuojasi griežtomis sąlygomis, ir polinukleotidais, tokiais kaip PCR pradmenys, polinukleotidų gausinimui, kurie koduoja polipeptido fragmentus. Šiais požiūriais tinkamiausi polinukleotidai yra tokie, kurie atitinka tinkamiausius polipeptido fragmentus, kurie aptariami toliau.

Polipeptidai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su RG1 polipeptidu, kuris turi fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su šių polipeptidų fragmentais, analogais ir dariniais. Terminas fragmentas, darinys ir analogas, kalbant apie polipeptidą, turintį fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, reiškia polipeptidą, kuris išlaiko iš esmės tą patį biologinį aktyvumą kaip ir šis polipeptidas.

Šio išradimo polipeptidas gali būti rekombinantinis polipeptidas, gamtinis polipeptidas arba sintetinis polipeptidas. Kai kuriuose tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose jis yra rekombinantinis polipeptidas.

Fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptido fragmentas, darinys arba analogas gali būti (i) toks, kuriame viena arba daugiau aminorūgščių liekanų yra pakeistos konservatyvių arba nekonservatyvių aminorūgščių liekanomis (geriau konservatyvių aminorūgščių liekanom), ir tokios pakeistos aminorūgščių liekanos gali būti koduojamos arba gali būti nekoduojamos genetinio kodo, arba (ii) toks, kuriame į vieną arba daugiau aminorūgščių liekanų įeina pakaito grupė, arba (iii) toks, kur polipeptidas yra sulietas su kitu junginiu, tokiu kaip junginys, padidinantis polipeptido gyvavimo puslaidį (pavyzdžiui, polietilenglikolis), arba (iv) toks, kuriame papildomos aminorūgštys yra prijungtos prie polipeptido, kaip lyderinė arba sekretinė sekos arba seka, kuri yra naudojama polipeptido gryninimui. Manoma, kad išeinant iš čia duotų nurodymų, specialistai supras, kad tokie fragmentai, dariniai ir analogai patenka į šio išradimo sferą.

Šiuo požiūriu tarp ypatingai tinkamų šio išradimo įgyvendinimo variantų yra polipeptidai, turintys RG1 aminorūgščių seką, parodytą fig.2 (SEQ ID NO: 2), jo variantai, analogai, dariniai ir fragmentai ir fragmentų variantai, analogai ir dariniai.

Tarp tinkamiausių variantų yra tokie, kurie skiriasi nuo etalono konservatyvių aminorūgščių pakeitimais. Tokie pakeitimai yra tai, kad polipeptide pakeičiama duota aminorūgštis kita panašių charakteristikų aminorūgštimi. Paprastai konservatyviais pakeitimais yra laikomi tokie, kai tarp alifatinių aminorūgščių pakeičiamos viena kita Ala, Val, Leu ir Ile, viena kita pakeičiamos hidroksilo liekanas turinčios Ser ir Thr, pakeičiamos rūgštinės liekanas turinčios Asp ir Glu, pakeičiamos amidinės liekanas turinčios Asn ir Gln, bazinės liekanas turinčios Lys ir Arg ir pakeičiamos aromatinės liekanas turinčios Phe ir Thr.

Šiuo požiūriu kiti tinkamiausi variantai, analogai, dariniai ir fragmentai ir fragmentų variantai, analogai ir dariniai yra tokie, kurie turi RG1 polipeptido fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, kurioje keletas, 5-10, 1-5, 1-3, 2, 1 arba nei vienos aminorūgščių liekanų yra pakeistos, išimtos arba pridėtos bet kokių derinių. Ypatingai tinkami iš jų yra neveiksmingi pakeitimai, pridėjimai ir delecijos, kurie nepakeičia RG1 polipeptido savybių ir aktyvumo. Šia prasme ypatingai tinkami yra konservatyvūs pakeitimai. Patys tinkamiausi

yra polipeptidai, turintys fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką be pakeitimų.

Geriau, kai šio išradimo polipeptidai ir polinukleotidai yra pateikiami išskirtoje formoje, o dar geriau išgrynintoje iki homogeniškumo formoje.

Šio išradimo polipeptidai taip pat apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą bei polipeptidus, kurie turi bent jau 70 % panašumą (geriau bent jau 70 % identiškumą) į fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą, geriau bent 90 % panašumą (geriau bent jau 90 % identiškumą) į fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą, ir dar geriau bent 95 % panašumą (geriau bent jau 95 % identiškumą) į fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidą ir taip pat apima tokių polipeptidų dalis, kurioje paprastai yra bent jau 30 aminorūgščių, geriau bent 50 aminorūgščių.

Kaip yra žinoma specialistams "panašumas" tarp dviejų polipeptidų yra nustatomas lyginant vieno ir kito peptido aminorūgščių sekas ir jų aminorūgščių konservatyvius pakeitimus.

Šio išradimo polipeptidų fragmentai ir dalys gali būti naudojamos atitinkamiems pilno ilgio polipeptidams gauti peptidų sintezės būdu; todėl šie fragmentai gali būti naudojami kaip tarpinės medžiagos pilno ilgio polipeptidams gauti.

Fragmentai

Taip pat tarp tinkamiausių šio išradimo aspekto įgyvendinimo variantų yra polipeptidai, sudarantys RG1 fragmentus, konkrečiau fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptido fragmentus ir fig.2 (SEQ ID NO: 2) RG1 variantų ir darinių fragmentus.

Šiuo požiūriu fragmentas yra polipeptidas, turintis aminorūgščių seką, kuri ištiesai yra tokia kaip dalis bet ne visa aukščiau minėtų RG1 polipeptidų ir jo variantų arba darinių aminorūgščių seka.

Tokie fragmentai gali būti "savarankiški", t.y. jie nėra dalis arba nėra sulieti su kitomis aminorūgštimis arba polipeptidais, arba jie gali įeiti į didesnį polipeptidą, kurio dalį arba sritį jie sudaro. Kai jie įeina į didesnį polipeptidą, geriau, kai čia aptariami fragmentai sudaro vieną ištinę sritį. Tačiau į atskirą didelį polipeptidą gali įeiti keletas fragmentų. Pavyzdžiui, kai kurie tinkamiausi įgyvendinimo variantai yra susiję su šio išradimo RG1 polipeptido fragmentu,

kuris yra polipeptido pirmtake, suprojektuotame ekspresuoti šeimininke ir turinčiame heterologines pre- ir propolipeptidines sritis, prijungtas prie RG1 fragmento amino-galo, ir papildomą sritį, prijungtą prie šio fragmento karboksi-galo. Todėl fragmentai viena čia pateikto aspekto prasme reiškia sulieto polipeptido arba sulieto išvesto iš RG1 baltymo dalį arba dalis.

Šio išradimo polipeptidinių fragmentų atstovaujančiais pavyzdžiais gali būti paminėti fragmentai, kurie turi nuo maždaug 25 iki maždaug 331 aminorūgštis.

Šiame kontekste "maždaug" apima konkrečiai nurodytą intervalą ir intervalus, didesnius arba mažesnius keletu, 5, 4, 3, 2 arba 1 aminorūgštimi abiejuose galuose. Pavyzdžiui, maždaug 331 aminorūgštis šiame kontekste reiškia polipeptido fragmentą nuo 25 plus arba minus keletas, 5, 4, 3, 2 arba 1 aminorūgštis iki 331 plus arba minus keletas, 5, 4, 3, 2 arba 1 aminorūgštis liekanų, t.y. intervalą nuo 25 minus keletas aminorūgščių iki 331 plus keletas aminorūgščių platumo iki nuo 25 plus keletas aminorūgščių iki 331 minus keletas aminorūgščių siaurumo.

Šiuo požiūriu yra labai tinkamos nurodytos ribos plus arba minus 5 aminorūgštys iš abiejų galų. Ypatingai tinkamos yra nurodytos ribos plus arba minus 3 aminorūgštys iš abiejų galų. Nepaprastai tinkamos yra nurodytos ribos plus arba minus 1 aminorūgštis iš abiejų galų. Šiuo požiūriu geriausia yra fragmentai nuo maždaug 25 iki maždaug 331 aminorūgštis.

Tarp ypatingai tinkamų šio išradimo fragmentų yra nukirpti RG1 mutantai. Nukirpti RG1 mutantai apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) sekos darinius arba variantus, išskyrus nepertraukiamos liekanų eilės deleciją (t.y. nepertraukiamą sritį arba dalį), kuri apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos amino-galą, arba nepertraukiamą liekanų eilės, kuri apima karboksi-galą, arba, kaip dvigubo nukirpimo mutantuose, dviejų nepertraukiamų liekanų serijų, vienos, apimančios amino-galą, ir kitos, apimančios karboksi-galą, deleciją. Fragmentai, turintys aukščiau nurodytas ilgio ribas, taip pat yra tinkamiausi nukirptų fragmentų įgyvendinimo variantai, kurie bendrai imant yra tinkamiausi iš fragmentų.

Ypatingai tinkami šiuo išradimo aspektu yra fragmentai, kuriems yra būdingi RG1 biologiniai ir/arba imunologiniai atributai. Tokiais fragmentais yra fragmentai, turintys numatytas RG1 struktūrines sritis, kurie apima bent jau

nuo 31 iki 103, 138-221 ir 278-330 aminorūgščių, arba fragmentai, naudojami antikūnams generuoti, tokie kaip aprašyti 4 pavyzdyje.

Tam tikros šiuo požiūriu tinkamiausios sritys yra parodytos fig.2 (SEQ ID NO: 2) ir apima, bet neapsiriboja, aukščiau minėtų tipų sritis, nustatytas analizuojant aukščiau parodytą fig.2 (SEQ ID NO: 2) aminorūgščių seką.

Tarp labai šiuo požiūriu tinkamų fragmentų yra tokie, kurie apima RG1 sritis, kurios sujungia kelias struktūrines ypatybes, tokias kaip aukščiau nurodytos ypatybės. Šiuo požiūriu dvi spondino ir viena trombospondino sritys, apimančios atitinkamai maždaug 31-103, 138-221 ir 278-330 aminorūgštis, kurios yra būdingos ekstraląstelių matricinių baltymų Mindino/spondino šeimei, yra ypatingai tinkamos sritys. Tokios sritys gali įeiti į didesnį polipeptidą arba, kaip jau minėta, jos pačios gali būti tinkamiausias šio išradimo fragmentas. Reikia suprasti, kad šiame paragrafe naudojamas terminas "maždaug" turi prasmę, kuri buvo aptarta bendrai aptariant fragmentus.

Kitos tinkamiausios sritys yra tos, kurios tarpininkauja RG1 aktyvumo pasireiškimui. Labiausiai tinkami šiuo požiūriu yra fragmentai, kurie turi RG1 cheminį, biologinį ir kitokį aktyvumą, įskaitant panašaus arba didesnio aktyvumo, arba sumažinto nepageidaujamo aktyvumo fragmentus. Labai pageidautini šiuo požiūriu yra fragmentai, kurie turi sritis, homologiškas giminingų polipeptidų, tokių kaip kiti Mindino šeimos baltymai, apimantys RG1, veikliajai sekai arba padėčiai, arba ir sekai, ir padėčiai.

Vektoriai, šeimnininko ląstelės ir ekspresijos sistemos

Šis išradimas taip pat yra susijęs su vektoriais, kurie apima šio išradimo polinukleotidus, šeimnininko ląstelėmis, kurios yra sukuriamos genų inžinerijos būdu su šio išradimo vektoriais ir šio išradimo polipeptidų produkavimu, panaudojant rekombinantinius metodus. Tokie metodai yra aprašyti Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 ir Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

Šeimnininko ląstelės gali būti sukuriamos genų inžinerijos būdu, įterpiant polinukleotidus šio išradimo polipeptidams ekspresuoti. Pavyzdžiui,

polinukleotidai gali būti įvedami į šeimininko ląsteles panaudojant žinomus infekavimo, transdukcijos, transfekcijos, transvekcijos ir transformacijos metodus. Polinukleotidai gali būti įvedami vieni arba su kitais polinukleotidais. Tokie kiti polinukleotidai gali būti įvedami nepriklausomai, kartu su šio išradimo nukleotidais arba prijungti prie jų.

Taigi, pavyzdžiui, šio išradimo polinukleotidai gali būti transfekuojami į šeimininko ląsteles su kitu atskiru polinukleotidu, koduojančiu atrankinį markerį, naudojant standartines kotransfekcijos ir selekcijos metodikas, pavyzdžiui, į žinduolio ląsteles. Šiuo atveju polinukleotidai paprastai bus stabiliai įkorporuojami į šeimininko ląstelių genomą.

Kitu atveju, polinukleotidai gali būti prijungti prie vektoriaus, turinčio atrankų markerį dauginimui šeimininke. Šis vektoriaus konstruktas gali būti įvedamas į šeimininko ląstelę panaudojant aukščiau minėtus metodus. Bendru atveju, plazmidinis vektorius yra įvedamas DNR nuosėdų pavidalu, tokių kaip kalcio fosfato nuosėdos komplekse su įkrautu lipidu. Polinukleotidams į šeimininką įvesti taip pat gali būti naudojama eletroporacija. Jeigu vektorius yra virusas, jis gal būti įkraunamas *in vitro* arba įvedamas į įkraunamą ląstelę ir toks virusas gali būti transdukuotas į ląsteles. Specialistams yra gerai žinoma daugybė įvairiausių ir įprastų metodikų, tinkančių nukleotidams paruošti ir jiems įvesti į ląsteles pagal šį išradimo aspektą. Tokios metodikos yra smulkiai aprašytos aukščiau cituotame Sambrook et al., kuris yra pavyzdys daugelio laboratorinių vadovėlių, detalizuojančių šias metodikas. Pagal šį išradimo aspektą, vektorius gali būti, pavyzdžiui, plazmidinis vektorius, viengrandinis arba dvigrandinis faginis vektorius, viengrandinės arba dvigrandinės RNR arba DNR virusinis vektorius. Tokie vektoriai gali būti įvedami į ląsteles kaip polinukleotidai, geriau DNR, gerai žinomais DNR ir RNR įvedimo į ląsteles būdais. Vektoriai faginių ir virusinių vektorių atveju taip pat gali būti ir geriausiai gali būti įvedami į ląsteles kaip įkrauti arba įkapsiduoti virusai gerai žinomais infekavimo ir transdukcijos metodais. Virusiniai vektoriai gali būti kompetentiniai replikacijos atžvilgiu arba defektyvūs replikacijos atžvilgiu. Pastaruoju atveju viruso dauginimasis paprastai vyks tik komplementinėse šeimininko ląstelėse.

Tinkamiausi iš vektorių tam tikrais atžvilgiais yra vektoriai, pritaikyti šio išradimo polinukleotidų ir polipeptidų ekspresijai. Paprastai tokie vektoriai turi

savyje cis-veikiančias kontrolines sritis, veiksmingas ekspresijai šeimininke, veiksmingai prijungtas prie ekspresuojamo polinukleotido. Reikiamus transveikiančius faktorius pateiks šeimininkas, turintis komplementinį vektorių, arba pats vektorius, įvedus jį į šeimininką.

Tam tikruose šiuo požiūriu tinkamiausiuose įgyvendinimo variantuose vektoriai numatomi specifinei ekspresijai. Tokia specifinė ekspresija gali būti indukuojama ekspresija arba ekspresija tikrai tam tikro tipo ląstelėse arba ir indukuojama, ir specifiška ląstelėms. Tarp indukuojamų vektorių ypatingai tinkami yra vektoriai, kurie gali būti indukuoti ekspresijai lengvai manipuliuojamų aplinkos faktorių pagalba, tokių kaip temperatūra ir maitinimo terpės priedai. Specialistams yra gerai žinoma daugybė paprastai naudojamų įvairiausių vektorių, įskaitant konstitutyvinius ir indukuojamus vektorius, kurie gali būti naudojami šio išradimo tikslams prokariotiniuose ir eukariotiniuose šeimininkuose.

Genų inžinerijos būdu sukurtos šeimininko ląstelės gali būti auginamos įprastoje maitinimo terpėje, kuri gali būti modifikuojama kaip reikia, tarp kitų, aktyvuojančiais promotoriais, parenkamais transformantais arba amplifikacijos genais. Auginimo sąlygos, tokios kaip temperatūra pH ir panašios, anksčiau naudojamos pasirinkto šeimininko ląstelėms bendrai ekspresijai paprastai bus tinkamos ir šio išradimo polipeptidų ekspresijai, kas bus aišku šios srities specialistams.

Šio išradimo polipeptido ekspresijai gali būti naudojama didelė ekspresijos vektorių įvairovė. Tokiais vektoriais yra chromosominiai, episominiai ir virusiniai vektoriai, pvz. vektoriai išvesti iš bakterinių plazmidžių, iš bakteriofago, iš mielių episomų, iš mielių chromosominių elementų, iš virusų, tokių kaip bakulovirusai, papova virusai, tokie kaip SV40, vaccinia virusai, adenovirusai, naminių paukščių raupų virusai, pseudopasiutligės virusai, retrovirusai ir alfavirusai, tokie kaip Sindbis virusas, ir vektoriai, išvesti iš jų derinių, tokie kaip išvesti iš plazmidės ir bakteriofago genetinių elementų, tokių kaip kosmidės ir fagemidės; visi jie gali būti naudojami ekspresijai pagal šį šio išradimo aspektą. Bendrai imant, bet koks vektorius, tinkamas išlaikyti, dauginti arba ekspresuoti polinukleotidams, skirtiems polipeptidui ekspresuoti šeimininke, gali būti naudojami šia prasme.

[vektorių gali būti įterpta reikiama DNR seka bet kuriuo iš daugybės žinomų ir įprastų būdų. Bendrai paėmus, ekspresijai DNR seka yra prijungiama prie ekspresijos vektoriaus, skaldant DNR seką ir ekspresijos vektorių viena arba daugiau restrikcijos endonukleazių ir po to sujunginat restrikcijos fragmentus kartu, naudojant T4 DNR ligazę. Restrikcijos ir sujungimo metodikos, kurios gali būti naudojamos šiame išradime, yra gerai žinomos ir įprastos specialistams. Tinkamos šiuo požiūriu metodikos ir ekspresijos vektorių konstravimo metodikos, naudojant kitokius metodus, kurie yra taip pat gerai žinomi ir įprasti specialistams, yra aprašytos labai smulkiai Sambrook et al., kuris čia jau buvo cituotas.

DNR seka ekspresijos vektoriuje yra veiksmingai prijungta prie tinkamos ekspresijos kontrolinės sekos(u), įskaitant, pavyzdžiui, promotorių tiesioginei RNR transkripcijai. Tokių promotorių atstovais yra fago lambda PL promotorius, *E. coli* tac, lac, trp, tac ir trc promotoriai, SV40 ankstyvasis ir vėlyvasis promotoriai ir retrovirusinių LTR promotoriai, paminint tik keletą gerai žinomų promotorių. Reikia suprasti, kad daug čia nepaminėtų promotorių, tinkamų naudoti šiam išradimo aspektui, yra gerai žinomi ir juos nesunkiai gali panaudoti specialistai parodytu šio išradimo aptarime ir pavyzdžiuose būdu.

Bendrai imant, ekspresijos konstruktuose bus transkripcijos iniciacijos ir baigmės vietos, ir transkribuotoje srityje ribosomos rišimo vieta transliacijai. Koduojanti transkriptų dalis, kurią ekspresuoja konstruktai, apims transliacijos iniciacijos AUG pradžioje ir baigmės kodoną, reikiamoje vietoje transliuojamo polipeptido gale.

Be to, konstruktuose gali būti kontrolinės sritys, kurios reguliuoja bei sukelia ekspresiją. Bendrai imant, pagal daugelį įprastų praktinių metodų, tokios sritys veiks kontroliuodamos transkripciją, tokios kaip, tarp kitų, represoriaus rišimo vietos ir ekspresijos stiprintojai.

Dauginimo ir ekspresijos vektoriai paprastai turės savyje atrankius markerius. Tokie markeriai taip pat gali būti tinkami gausinimui, arba šiam tikslui vektoriuose gali būti papildomi markeriai. Šiuo požiūriu geriau, kai vektoriuose yra vienas arba daugiau atrankių markerių genų, kad būtų gaunamas fenotipinis charakteringas bruožas transformuotų šeiminingo ląstelių selekcijai. Tinkamiausiais markeriais yra dihidrofolato reduktazės,

neomicino, puromicino arba hygromicino rezistentiškumo eukariotinių ląstelių kultūrose ir tetraciklino, teomicino, kanamicino arba ampicilino rezistentiniai genai, auginant *E. coli* ir kitas bakterijas.

Vektorius, turintis atitinkamą DNR seką, kaip jau buvo aprašyta, o taip pat atitinkamą promotorių ir kitas tinkamas kontrolines sekas, gali būti įvedamas į tinkamą šeimnininką, naudojant įvairius gerai žinomus metodus, tinkančius norimo polipeptido ekspresijai. Atstovaujančiais tinkamo šeimnininko pavyzdžiais yra bakterijų ląstelės, tokios kaip *E. coli*, *Streptomyces* ir *Salmonella typhimurium* ląstelės; grybų ląstelės, tokios kaip mielių ląstelės; vabzdžių ląstelės, tokios kaip *Drosophila S2* ir *Spodoptera Sf9* ląstelės; gyvūnų ląstelės, tokios kaip CHO, COS ir Bowes'o melanomos ląstelės; ir augalų ląstelės; tinkamiausios yra vabzdžių ląstelės BTI-TN-5B1-4. Šeimnininkai daugybei ekspresijos konstrukto yra gerai žinomi, ir specialistai pagal šį aprašymą sugebės nesunkiai parinkti šeimnininką šio išradimo polipeptidų ekspresijai.

Ekspresijai taip pat gali būti naudojamos įvairios žinduolių ląstelių kultūros. Žinduolių ekspresijos sistemų pavyzdžiais yra beždžionių inkstų fibroblastų COS-7 linijos Gluzman et al., *Cell* 23: 175, 1991). Kitos ląstelių linijos, galinčios ekspresuoti panašų vektorių yra, pavyzdžiui, C 127, 3T3, CHO, HeLa, žmogaus inkstų 293 ir BHK ląstelių linijos. Žinduolių šeimnininkų ląstelėse gali būti naudojama daug virusinių ekspresijos sistemų. Tais atvejais, kai kaip ekspresijos vektorius yra naudojamas adenovirusas, polinukleotidų sekos, koduojančios RG1, gali būti įjungtos į adenoviruso transkripcijos/transliacijos kompleksą, susidedantį iš vėlyvojo promotoriaus ir susidedančios iš trijų dalių lyderinės sekos. Įterpimas į neesmines E1 ir E3 viruso genomo sritis duos gyvybingą virusą, galintį ekspresuoti RG1 infekuotose šeimnininko ląstelėse (Logan and Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-59, 1984). Be to, ekspresijai šeimnininko žinduolio ląstelėse padidinti gali būti naudojami transkripcijos stiprintojai, tokie kaip Rous sarkomos viruso (RSV) stiprintojas.

Dar konkrečiau, šis išradimas taip pat apima rekombinantinius konstruktus, tokius kaip ekspresijos konstruktai, turintys vieną arba daugiau aukščiau aprašytų sekų. Šie konstruktai turi vektorių, tokį kaip plazmidė arba virusinis vektorius, į kurį buvo įterpta tokia šio išradimo seka. Seka buvo

įterpta tiesioginės arba atvirkštinės orientacijos. Tam tikruose šiuo požiūriu tinkamaisiuose įgyvendinimo variantuose konstrukte taip pat yra reguliatorinės sekos, įskaitant, pavyzdžiui, promotorių, veiksmingai prijungtą prie sekos. Specialistai žino daugybę tinkamų vektorių ir promotorių ir yra daug prekybinių vektorių, tinkamų naudoti šiame išradime.

Pavyzdžiui, iš prekybininkų gaunami vektoriai yra tokie. Tarp tinkamų naudoti bakterijose vektorių yra pQE70, pQE60 ir pQE-9, gaunami iš Qiagen USA (Valencia, CA); pBS vektoriai, Phagescript® vektoriai, Bluescript® vektoriai, pNH8A, pNH18A, pNH46A, gaunami iš Stratagene (LaJolla, CA); ir rtrc99a, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, gaunami iš Pharmacia Biotech (Piscataway, N.J.). Pats tinkamiausias yra pTrcHisB vektorius, gaunamas iš Invitrogen. Tarp tinkamiausių eukariotinių vektorių yra pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXTI ir pSG, gaunami iš Stratagene; ir PSVK3, pBPV, pMSG ir pSVL, gaunami iš Pharmacia Biotechn. Pats tinkamiausias yra pCneo vektorius, gaunamas iš Promega. Šie vektoriai yra išvardinti vien tik iliustracijai daugelio iš prekybininkų gaunamų ir gerai žinomų vektorių, kurie yra prieinami specialistams ir gali būti naudojami šiame išradime. Turėtų būti suprantama, kad bet kokia kita plazmidė arba vektorius, tinkantys, pavyzdžiui, įvedimui, išlaikymui, dauginimui arba šio išradimo polinukleotido arba polipeptido ekspresijai šeimininke gali būti naudojami šio išradimo aspektu.

Promotorių sritys gali būti pasirinktos iš bet kokio norimo geno, naudojant vektorius, kurie turi reporterinį transkripcijos vieneta, neturintį promotoriaus srities, tokį kaip chloramfenikolio acetiltransferazės ("cat") transkripcijos vienetas, pagal transkripcijos kryptį nuo restrikcijos vietos arba vietų promotoriaus-kandidato fragmento įvedimui; t.y. fragmento, kuris gali turėti promotorių. Kaip yra gerai žinoma, promotorių turinčio fragmento įvedimas prie restrikcijos vietos prieš transkripcijos kryptį nuo cat geno sukelia CAT aktyvumo pasireiškimą, kurį galima aptikti standartine CAT analize. Šiam tikslui tinkami vektoriai yra gerai žinomi ir lengvai gaunami. Du tokie vektoriai yra pKK232-B ir pCM7. Taigi, promotoriai šio išradimo polinukleotidų ekspresijai apima ne tik gerai žinomus ir lengvai prieinamus promotorius, bet taip pat ir promotorius, kurie nesunkiai gali būti gaunami pagal aukščiau aprašytas metodikas, naudojant reporterinį geną.

Tarp žinomų bakterinių promotorių, tinkamų šio išradimo polinukleotidų ir polipeptidų ekspresijai, yra *E.coli* lac1 ir lacZ promotoriai, T3 ir T7 promotoriai, T5 tac promotorius, lambda PR, PL promotoriai, trp promotorius ir trc hibridinis promotorius, kuris yra išvestas iš trp ir lac promotorių. Tarp žinomų eukariotinių promotorių, šia prasme tinkami yra CMV betarpiškai ankstyvasis promotorius, HSV timidino kinazės promotorius, ankstyvasis ir vėlyvasis SV40 promotoriai, retrovirusiniai LTR promotoriai, tokie kaip Rous'o sarkomos viruso ("RSV") ir metalotioneino promotoriai, tokie kaip pelės metalotioneino-1 promotorius.

Atitinkamų vektorių ir promotorių pasirinkimas ekspresijai šeimininko ląstelėse yra gerai žinoma procedūra, o ekspresijos vektorių konstravimui, vektoriaus įvedimui į šeimininką ir ekspresijai šeimininke reikalingos metodikos specialistams yra įprastos.

Bendrai imant, į rekombinantinius ekspresijos vektorius įeis replikacijos pradžia - promotorius, išvestas iš labai ekspresuojančio geno, kad transkripcija būtų nukreipta pagal struktūrinės sekos kryptį, - ir atrankus markeris, duodantis galimybę išskirti vektorių turinčias ląsteles po sąlyčio su vektoriumi.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su šeimininko ląstelėmis, turinčiomis aukščiau aprašytus ir aptartus konstruktus. Šeimininko ląstelės gali būti aukštesnės eukariotinės ląstelės, tokios kaip žinduolių ląstelės, arba žemesnės eukariotinės ląstelės, tokios kaip mielių ląstelės, arba šeimininko ląstelė gali būti prokariotinė ląstelė, tokia kaip bakterijos ląstelė. Konstruktai šeimininko ląstelėse gali būti naudojami įprastu būdu, gaunant rekombinantinės sekos koduojamą geno produktą.

Polipeptidai gali būti ekspresuojami žinduolių ląstelėse, mielėse, bakterijose ir kitose ląstelėse, kontroliuojant tinkamiems promotoriams. Tokiems baltymams gauti taip pat gali būti naudojamos ir neląstelinės transliacijos sistemos, naudojant iš šio išradimo DNR konstrukty išvestas RNR. Tinkami naudojimui prokariotiniuose ir eukariotiniuose šeimininkuose klonavimo ir ekspresijos vektoriai yra aprašyti Sambrook et al., kuris čia buvo cituotas.

DNR koduojamų šio išradimo polipeptidų transkripcija aukštesniųjų eukariotų ląstelėse gali būti padidinama, į vektorių įvedant stiprintojo seką.

Stiprintojai yra cis-veikiantys DNR elementai, paprastai maždaug 10-300 bp, kurie veikia didindami transkripcinį promotoriaus aktyvumą duoto šeimininko tipo ląstelėse. Stiprintojų pavyzdžiais yra SV40 stiprintojas, kuris yra randamas vėlyvojoje replikacijos pradžios pusėje ties 100-270 bp, citomegaloviruso ankstyvojo promotoriaus stiprintojas, poliomos stiprintojas vėlyvojoje replikacijos pradžios pusėje ir adenovirusų stiprintojai.

Šio išradimo polinukleotidai, koduojantys šio išradimo polipeptido heterologinę struktūrinę seką, paprastai bus įterpiami į vektorių, naudojant standartinės metodikas, taip, kad jis būtų veiksmingai prijungtas prie promotoriaus ekspresijos tikslams. Šis polinukleotidas bus tokioje padėtyje, kad transkripcijos pradžia vieta yra maždaug 5' padėtyje nuo ribosomos prijungimo vietos. Ribosomos prijungimo vieta bus 5' prie AUG, kuris inicijuoja ekspresuojamo polipeptido transliaciją. Bendrai paėmus, nebus kitų atviro skaitymo rėmelių, kurie prasidėtų iniciacijos kodonu, paprastai AUG ir būtų tarp ribosomos prijungimo vietos ir inicijuojančio AUG. Taip pat bendru atveju bus transliacijos stop-kodonas polipeptido gale ir bus poliadenilimo signalas ir transkripcijos baigmės signalas transkribuojamos srities maždaug 3' gale.

Trasliuojamo baltymo sekrecijai į endoplazminio retikulo liumeną, į periplazminę erdvę arba į ekstraląstelinę aplinką į ekspresuojamą baltymą gali būti įterpti atitinkami sekrecijos signalai. Šie signalai gali būti endogeniniai polipeptidui arba jie gali būti heterologiniai signalai. Gali būti ekspresuotas modifikuotos formos polipeptidas, toks kaip sulietas baltymas, ir jame gali būti ne tik sekrecijos signalai, bet taip pat ir papildomos heterologinės funkcinės sritys. Taigi, pavyzdžiui, polipeptido stabilumui ir išsilaikymui šeimininko ląstelėje pagerinti, gryninant arba po to manipuluojant su juo ir laikant, prie N-galo gali būti pridėdama papildomų aminorūgščių, ypač krūvį turinčių aminorūgščių, sritis. Be to, prie polipeptido gali būti pridėtos specialios sritys, kad būtų palengvintas jo gryninimas. Tokios sritys gali būti pašalinamos prieš galutinį polipeptido paruošimą. Peptidinių liekanų pridėjimas prie polipeptido sekrecijai arba išsiskyrimui sukelti, stabilumui padidinti ir gryninimui palengvinti, tarp kitų dalykų, yra įprastas ir specialistams gerai žinomas. Pavyzdžiui, kai yra reikalingas didelis kiekis RG1 antikūnams indukuoti, gali būti pageidaujami vektoriai, kurie nukreipia į aukštą sulietų baltymų, kurie yra lengvai gryninami, ekspresiją. Tokiais vektoriais yra, bet jais neapsiribojama,

daugiafunkciniai *E. coli* klonavimo ir ekspresijos vektoriai, tokie kaip Bluescript® (Stratagene), kuriame *rg1* kodavimo seka gali būti įjungta į vektorių rėmelyje su amino-galinio Met seka ir sekančiomis 7 β-galaktozidazės liekanomis taip, kad yra gaunamas hibridinis baltymas; pIN vektoriai (Van Heede and Shuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509, 1989) ir panašūs. PTrcHis vektoriai (Invitrogen, Carlsbad, CA) gali būti naudojami svetimų polipeptidų, kaip sulietų baltymų, turinčių polihistidino (6xHis) tag dėl greito gryninimo, ekspresijai. Tokiose sistemose pagaminti baltymai yra suprojektuoti taip, kad juose būtų atskėlimo vietos, tokios kaip enterokinazės skaldomos vietos, kad norint būtų galima išlaisvinti kolnuotą dominantį polipeptidą iš sulieto baltymo.

Po atitinkamo šeimininko kamieno transformacijos ir auginimo iki reikiamo ląstelių tankio, indukuojami promotoriai, jeigu yra, gali būti indukuoti panaudojant atitinkamas priemones (pvz. temperatūros pakeitimą arba sąlytį su cheminiu induktoriumi) ir ląstelės auginamos dar kurį laiką.

Tada paprastai ląstelės surenkamos centrifuguojant, suardomos fizikiniais arba cheminiais būdais ir gautas negrynintas ekstraktas laikomas tolimesniam gryninimui.

Baltymų ekspresijai naudotų mikrobu ląstelės gali būti suardomos bet kokių patogių būdu, įskaitant sušaldymo-atšildymo ciklus, veikimą ultragarsu, mechaninį suardymą arba panaudojant ląstelių lizavimo agentus; tokie būdai yra gerai žinomi specialistams.

RG1 polipeptidas gali būti išgaunamas ir išgryninamas iš rekombinantinių ląstelių kultūrų gerai žinomais būdais, įskaitant nusodinimą amonio sulfatu arba etanoliu, rūgštinę ekstrakciją, anijonų arba katijonų mainų chromatografiją, fosfoceliuliozės chromatografiją, hidrofobinės sąveikos chromatografiją, afininę chromatografiją, hidroksilapatito chromatografiją ir lecitino chromatografiją. Geriausia gryninimui naudoti didelio efektyvumo skysčių chromatografiją ("HPLC"). Gali būti naudojami gerai žinomi baltymų renatūracijos metodai, kad būtų regeneruojama aktyvi konformacija, jeigu polipeptidas išskyrimo ir gryninimo metu buvo denatūruotas. Įvairūs kiti gerai žinomi baltymų gryninimo metodai yra aprašyti Deutscher M., *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, San Diego, 1982; ir Scopes, R.,

Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New-York, 1982.

Kitu atveju, šio išradimo polipeptidai gali būti gauti tiesioginės sintezės būdu, naudojant kietafazius metodus (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield, J., *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963). Baltymų sintezė *in vitro* gali būti vykdoma naudojant rankines metodikas arba automatizaciją. Automatizuota sintezė gali būti vykdoma, pavyzdžiui, naudojant Applied Biosystems 431A peptidų sintezatorių (Perkin Elmer, Foster City, Calif) pagal gamintojo pateikiamas instrukcijas. Įvairūs RG1 fragmentai gali būti chemiškai sintezuojami atskirai ir sujungiami naudojant cheminius metodus, gaunant pilno ilgio molekulę.

Šio išradimo polipeptidai apima gamtinius išskirtus produktus, cheminės sintezės produktus ir produktus, gautus rekombinantiniais metodais iš prokariotinių arba eukariotinių šeiminių, įskaitant, pavyzdžiui, bakterijas, mieles, aukštesnius augalus, vabzdžius ir žinduolių ląsteles. Priklausomai nuo naudojamo šeiminių rekombinantinėse gavimo metodikose, šio išradimo polipeptidai gali būti glikozilinti arba gali būti neglikozilinti. Be to, šio išradimo polipeptiduose taip pat gali būti pradinė modifikuoto metionino liekana kai kuriais atvejais dėl šeiminių tarpininkaujamų procesų.

RG1 polipeptidų ir juos koduojančių polinukleotidų panaudojimas

Pagal šį išradimą *rg1* polinukleotidai ir RG1 polipeptidai gali turėti įvairų pritaikymą, ypačingai tokį, kuris išeina iš RG1 cheminių ir biologinių savybių. Papildomi pritaikymo variantai yra susiję su ląstelių proliferacijos ligų, tokių kaip prostatos vėžys, diagnozavimu ir gydymu. Šie išradimo aspektai yra iliustruojami toliau duodamame aptarime ir yra atskleisti aprašyme.

Šio išradimo polinukleotido ir polipeptido sekų panaudojimo loginis pagrindas dalinai remiasi chemine ir struktūrine homologija tarp čia aprašyto RG1 ir kitų ekstraląstelių matricinių molekulių ir padidinta RG1 ekspresija prostatos audiniuose, lyginant su kitais audiniais. RG1 gali būti naudojamas būklių, sutrikimų arba ligų, susijusių su neatitinkančiu normų prostatos audinio augimu, diagnozavimui ir gydymui. Tokiomis ligomis yra, bet jomis neapsiribojama, vėžys ir metastazinio auglio augimas.

Rg1 polinukleotido sekos gali būti naudojamos kaip DNR zondai ir kaip taikiniai antiprasminei ir riboziminei terapijai arba kaip matricos antiprasminių polinukleotidų gaminimui.

RG1 polipeptidai gali būti naudojami antikūnams prieš RG1 generuoti, kurie gal būti tinkami RG1 polipeptido kiekiams ląstelėse ir audiniuose nustatyti ir kaip taikiniai vaistams pirminiams ir metastaziniams augliams gydyti.

RG1 polipeptidai gali būti naudojami imuniniam atsakui į RG1 turinčias ląsteles stimuliuoti.

RG1 koduojantys polinukleotidai gali būti tinkami diagnostiniuose testuose RG1 koduojantiems polinukleotidams ląstelėse ir audiniuose nustatyti

Būklėse, susijusiose su RG1 ekspresija, tokiose kaip prostatos vėžys, gali būti pageidautina slopinti RG1 ekspresiją arba aktyvumą. RG1 ekspresija gali būti slopinama įvedant antiprasminius oligonukleotidus arba ribozimus. Kitu atveju, antikūnai, specifiskai atpažįstantys RG1 polipeptido dalis, kurios yra atsakingos už jo aktyvumą, gali būti skiriami ligoms arba būklėms, susijusioms su RG1 aktyvumu, gydyti.

Polinukleotidų testai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su *rg1* giminingų polinukleotidų panaudojimu komplementariems polinukleotidams nustatyti, pavyzdžiui, kaip diagnostinis reagentas. *Rg1* polinukleotidų, susijusių su liga, nustatymas duos priemonę diagnostikos *in vitro* ir *in vivo* patobulinimui, ir ji gali patvirtinti arba apibrėžti ligos diagnozę arba nustatyti polinkį į ligą, kuri atsiranda iš specifinės RG1 ekspresijos audinyje.

Individai, turintys mutacijas RG1 koduojančiame gene, gali būti aptikti DNR lygmenyje įvairiais būdais. Polinukleotidų mėginiai analizei gali būti gaunami iš paciento ląstelių, kaip antai iš kraujo, šlapimo, seilių, audinio biopsijos ir autopsijos medžiagos. Genominė DNR nustatymui gali būti naudojama tiesiogiai arba prieš analizę gali būti pagausinta fermentiniu būdu, naudojant PCR (Saiki et al., *Nature*, 324: 163-166, 1986). Tuo pačiu būdu taip pat gali būti naudojamos ir RNR arba kDNR. Kaip pavyzdys, *rg1* ekspresijai ir mutacijoms gali būti naudojami PCR pradmenys, komplementarūs RG1

koduojančiai polinukleotido sekai. Pavyzdžiui, pakeitus gausinamo produkto dydį, lyginant su normaliu genotipu, gali būti aptinkamos delecijos ir intarpai. Taškinės mutacijos gali būti aptinkamos hibridizuojant pagausintą DNR su radiožymėto *rg1* RNR arba, kitu atveju, radiožymėto *rg1* antiprasminėmis DNR sekomis. Puikiai atitinkančios sekos gali būti atskirtos nuo pseudoatitinkančių dupleksų skaldant RNaze A arba pagal lydymosi temperatūrų skirtumus.

Etaloninio geno ir mutacijų turinčių genų sekų skirtumai taip pat gali būti atskleisti tiesioginiu DNR sekvenavimu. Be to, klonuoti DNR segmentai gali būti naudojami kaip zondai specifiniams DNR segmentams nustatyti. Tokių metodų jautrumas gali būti labai padidintas tinkamai panaudojant PCR arba kitą gausinimo būdą. Pavyzdžiui, sekvenavimo pradmuo yra naudojamas su dvigrandininiu PCR produktu arba viengrandinine matricos molekule, generuota modifikuotos PCR būdu. Sekos nustatymas atliekamas įprastais metodais su radiožymes turinčiais polinukleotidais arba automatizuotais sekvenavimo būdais su fluorescenciniais laisvais galais.

Genetinis testavimas, paremtas DNR sekų skirtumais, gali būti nustatant DNR fragmentų elektroforezinio judrumo pokyčius geliuose, esant arba nesant denatūruojančių agentų. Mažos sekų delecijos ir intarpai gali būti vizualizuoti panaudojant didelės skyrimo gebos gel-elektroforezę. Skirtingų sekų DNR fragmentai gali būti atskirti leidžiant per denatūruojančio formamido gradiento gelius, kuriuose įvairių DNR fragmentų judrumai yra sulėtinami gelyje skirtingose padėtyse, priklausomai nuo jų specifinių arba dalinių lydymosi temperatūrų (žr., pvz., Myers et al., *Science*, 230: 1242, 1985).

Sekų pokyčiai specifinėse padėtyse taip pat gali būti atskleisti panaudojant nukleazų protekcijos testus, tokius kaip RNazės ir S1 protekcija, arba cheminiu skaldymo metodu (pvz., Catton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4397-4401, 1985).

Taigi, specifinės DNR sekos nustatymas gali būti realizuojamas būdais, tokiais kaip hibridizacija, RNazės protekcija, cheminis skaldymas, tiesioginis DNR sekvenavimas arba restrikcijos fermentų panaudojimas (pvz., restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmas ("RFLP") ir genominės DNR Southern'o blotingas).

Apart įprastos gel-elektroforezės ir DNR skenavimo, mutacijos taip pat gali būti aptiktos *in situ* analizės būdu.

Polipeptidų testai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su diagnostiniais testais, tokiais kaip kiekybiniai ir diagnostiniai testai RG1 polipeptido kiekiams ląstelėse ir kūno skysčiuose nustatyti, įskaitant normalių ir anomalių kiekių nustatymą. Tokiu būdu, pavyzdžiui, pagal šį išradimą diagnostinis testas RG1 polipeptido padidintai ekspresijai, lyginat su normaliais kontrolinio audinio mėginiais, nustatyti gali būti naudojamas neoplazijos, pavyzdžiui, prostatos vėžio, buvimui aptikti. Tokie diagnostiniai testai taip pat gali būti naudojami metastazinio auglio augimui aptikti. Specialistams yra žinomos testų metodikos, kurios gali būti naudojamos polipeptido, tokio kaip šio išradimo RG1 polipeptidas, mėginiuose iš šeimininko nustatyti. Tokiomis testų metodikomis yra radioimuninė analizė (RIA), konkurentinio surišimo testai, Western'o blotų analizė ir su fermentu surišta imunoabsorbcinė analizė (ELISA) bei fluorescenciškai aktyvuotų ląstelių rūšiavimas (FACS). Iš šių metodų dažniausiai yra naudojama ELISA. ELISA teste pirmiausia reikia pagaminti RG1 specifinį antikūną, geriau monokloninį antikūną. Be to, yra paprastai pagaminamas reporterinis antikūnas, kuris rišasi su monokloniniu antikūnu. Reporterinis antikūnas yra prijungiamas prie detektuojančio reagento, tokio kaip radioaktyvus, fluorescuojantis arba fermentinis reagentas, šiame pavyzdyje krienų peroksidazė.

Vykdamas ELISA testą, mėginys yra paimamas iš šeimininko ir inkubuojamas ant kieto pagrindo, pvz. polistireno lėkštelėje, kuris suriša mėginio polipeptidą. Visos laisvos polipeptido surišimo vietos ant lėkštelės tada yra padengiamos inkubuojant su nespecifiniu baltymu, tokiu kaip jaučio serumo albuminas. Po to lėkštelėje yra inkubuojamas monokloninis antikūnas ir per tą laiką monokloniniai antikūnai prisijungia prie bet kurių RG1 polipeptidų, surištų su polistireno lėkšte. Nesurištas monokloninis antikūnas nuplaunamas buferiu. Į lėkštelę įpilama sujungto su krienų peroksidaze reporterinio antikūno, kuris susiriša su prie RG1 prijungtu monokloniniu antikūnu. Tada nesusirišęs reporterinis antikūnas nuplaunamas. Po to į lėkštelę įpilama reagentų peroksidazės aktyvumui nustatyti, įskaitant

kolorimetrinį substratą. Imobilizuota peroksidazė, prijungta prie RG1 per pirminį ir antrinį antikūnus, duoda spalvotą reakcijos produktą. Spalvos kiekis, atsiradęs po tam tikro laiko tarpo, rodo mėginyje esančio RG1 polipeptido kiekį. Kiekybiniai rezultatai paprastai gaunami remiantis standartine kreive.

Konkurentinis testas gali būti naudojamas, kai RG1 specifiniai antikūnai yra prijungti prie kieto pagrindo, o žymėti RG1 ir iš šeimininko paimtas mėginys yra leidžiami per kietą pagrindą, ir prie kieto pagrindo prijungtos detektuojamos žymės kiekis gali būti koreliuojamas su RG1 kiekiu mėginyje.

Šie ir kiti testai, tarp kitų vietų, yra aprašyti Hampton et al. (*Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, Minn, 1990) ir Maddox et al. (*J. Exp. Med.* 158: 12111, 1983).

Antikūnai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su antikūnais, kurie specifiškai rišasi su RG1, čia vadinami RG1 antikūnais. Padidinta RG1 ekspresija prostatos audiniuose ir jo išsidėstymas ląstelių paviršiuje pateikia puikaus markerio charakteristikas atrinkimo, diagnozavimo, prognozavimo, stebėjimo testams ir vaizdo gavimo būdams. Be to, šios charakteristikos rodo, kad RG1 gali būti puikus taikynys terapiniuose metoduose, tokiuose kaip tikslinė antikūnų terapija, imunoterapija ir genų terapija. Čia naudojamas terminas "specifiškai rišasi su" reiškia antikūno ir polipeptido sąveiką, kuri priklauso nuo konkrečios struktūros (t.y. antigeninės determinantės arba epitopo) buvimo polipeptide; kitaip tariant, antikūnas atpažįsta ir prisijungia prie specifinės polipeptido struktūros, o ne prie baltymų aplamai.

RG1 polipeptidai, jų fragmentai arba kiti dariniai, arba jų analogai, arba juos ekspresuojančios ląstelės gali būti naudojamos kaip imunogenas gauti prieš juos nukreiptiems antikūnams (Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Šie antikūnai gali būti, pavyzdžiui, polikloniniai arba monokloniniai. Šis išradimas taip pat apima chimerinius, viengrandinius, humanizuotus arba žmogaus antikūnus, taip pat Fab fragmentus arba Fab ekspresijos bibliotekos produktą. Tokiems antikūnams ir fragmentams gauti yra naudojamos įvairios žinomoms metodikos.

Antikūnai, generuoti prieš šio išradimo seką turinčius polipeptidus, gali būti gaunami tiesiogiai suleidžiant polipeptidus gyvūnui arba skiriant

polipeptidus gyvūnui, geriau ne žmogui. Taip gautas antikūnas tada susiriš su pačiu polipeptidu. Šiuo būdu net seka, koduojanti tik šių polipeptidų fragmentą, gali būti naudojama generuoti antikūnams, susirišantiems su pilnais natyviais polipeptidais. Tada tokie antikūnai gali būti naudojami polipeptidui išskirti iš šį polipeptidą ekspresuojančio audinio.

Monokloniniams antikūnams gauti gali būti naudojama bet kokia metodika, kuri duoda nepertraukiamos ląstelių linijos kultūrų produkuojamus antikūnus. Pavyzdžiais yra hibridomų metodas (Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975), žmogaus B-ląstelių hibridomų metodas (Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72, 1983) ir EBV-hibridomų metodika žmogaus monokloniniams antikūnams gauti (Cole et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985).

Be to, buvo sukurtos ir gali būti naudojamos metodikos gauti "chimeriniams antikūnams", sujungiant pelės antikūno geno galą su žmogaus antikūno genais, gaunant molekulę su atitinkamu antigeniniu specifiškumu ir biologiniu aktyvumu (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855, 1984; Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608, 1984; Takeda et al., *Nature* 314: 452-454, 1985). Kitu atveju, metodikos, aprašytos viengrandiniams antikūnams gauti (JAV patentas Nr. 4,946,778), gali būti pritaikytos RG1-specifiniams viengrandiniams antikūnams gauti.

Be to, "žmogiški" antikūnai gali būti pagaminti, naudojant JAV patentuose Nr.5,877,397 ir Nr.5,569,825, kurie čia pridedami pilnos apimties kaip literatūros šaltiniai, aprašytus metodus.

Antikūnai taip pat gali būti pagaminti indukuojant *in vivo* limfocitų populiacijos produkavimą arba atliekant rekombinantinių imunoglobulino bibliotekų arba labai specifinių rišančių reagentų grupių skryningą, kaip aprašyta Orlandi et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837, 1989) ir Winter and Milstein (*Nature* 349: 293-299, 1991).

Taip pat gali būti generuoti antikūnų fragmentai, kuriuose yra specifinės RG1 surišimo vietos. Pavyzdžiui, tokiais fragmentais yra, bet jais neapsiribojama, F(ab')₂ fragmentai, kurie gali būti pagaminti panaudojant antikūno molekulės skaldymą pepsinu, ir Fab fragmentai, kurie gali būti generuojami redukuojant F(ab')₂ fragmentų disulfidinius tiltelius. Kitu atveju, gali būti sukonstruotos Fab ekspresijos bibliotekos, leidžiančios greitai ir

lengvai identifikuoti norimo specifiškumo monokloninio Fab fragmentus (Huse et al., *Science* 256: 1270-1281, 1989).

Čia pateikta RG1 aminorūgščių seka gali būti naudojama parinkti specifinėms RG1 sritims antikūnams generuoti. Specialistai supras, kad RG1 polipeptido sritys arba epitopai, prieš kuriuos yra nukreipti antikūnai, gali kisti priklausomai nuo numatomos taikymo srities. Pavyzdžiui, antikūnai, numatyti naudoti imunoanalizėje su membrana surištam RG1 ant prostatos ląstelių aptikti, turėtų būti nukreipti prieš prieinamus RG1 polipeptido epitopus. RG1 polipeptido sritys, kurios rodo imunogeninę struktūrą, o taip pat kitos sritys ir dalys, gali lengvai būti identifikuotos, naudojant įvairius kitus specialistams žinomus būdus, tokius kaip Chou-Fasman'o, Gamier-Robinson'o arba Jameson-Wolf'o analizė. Tokias liekanas turintys fragmentai yra ypatingai tinkami anti-RG1 antikūnams generuoti. Ypatingai tinkamais fragmentais yra, bet jais neapsiribojama, sekos PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8); HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10); DAGTDSGFTFSSPNFATIRQDTV (SEQ ID NO: 11) ir NEIVDSASVPET (SEQ ID NO: 12). Polikloninių antikūnų generavimas prieš šias sritis yra aprašytas 4 pavyzdyje.

Šio išradimo antikūnai gali būti ypatingai tinkami diagnostiniuose testuose, vaizdo gavimo metodologijose ir terapiniuose methoduose prostatos vėžiui kontroliuoti. Išradime pateikiami įvairūs imunologiniai testai, tinkantys RG1 polipeptidams nustatyti ir prostatos vėžiui diagnozuoti. Į tokius testus paprastai įeina vienas arba daugiau RG1 antikūnų, galinčių atpažinti ir surišti RG1 polipeptidą. Patys tinkamiausi antikūnai selektyviai susiriš su RG1 ir nesusiriš (arba silpnai susiriš) su ne-RG1 polipeptidais. Testai apima įvairaus specialistams žinomo pobūdžio imunologinius testus, įskaitant, bet neapsiribojant, įvairaus tipo radioimunotestus, su fermentu surišto imunosorbento testus ir panašius. Be to, šiame išradime taip pat yra pateikiami imunologiniai vaizdo gavimo būdai, galintys aptikti prostatos vėžį, įskaitant, bet neapsiribojant, radioscintigrafinius vaizdo gavimo būdus, naudojant žymėtus RG1 antikūnus. Tokie testai gali būti naudingi klinikoje prostatos vėžiui aptikti, kontroliuoti ir prognozuoti.

Aukščiau aprašyti antikūnai gali būti naudojami šio išradimo polipeptidą ekspresuojantiems klonams išskirti arba identifikuoti arba polipeptidui gryninti

prijungiant antikūną prie kieto pagrindo išskyrimui ir/arba gryninimui afininės chromatografijos metodu.

Be to, RG1 antikūnai gali būti naudojami RG1 atžvilgiu teigiamoms ląstelėms išskirti, naudojant ląstelių rūšiavimo ir gryninimo metodus. Konkrečiau RG1 antikūnai gali būti naudojami prostatos vėžio ląstelėms išskirti iš ksenografo auglio audinio, iš ląstelių kultūros ir t.t., naudojant antikūnais paremtą ląstelių rūšiavimo arba afininio gryninimo metodus. Iš kitų RG1 antikūnų panaudojimo galimybių paminėtinas anti-idiotipinių antikūnų, kurie imituoja RG1 polipeptidą, generavimas.

RG1 antikūnai gali būti naudojami prostatos vėžiui arba auglio metastazėms aptikti. Tokių RG1 turinčių ląstelių buvimas įvairiuose biologiniuose mėginiuose, įskaitant serumą, prostatos ir kitų audinių biopsijos mėginiuose, gali būti nustatomas panaudojant RG1 antikūnus. Be to, RG1 antikūnai gali būti naudojami įvairiuose vaizdo gavimo metoduose, tokiuose kaip imunoscintigrafija su Tc-99m (arba kitu izotopu) konjuguotu antikūnu. Pavyzdžiui, vaizdo gavimo metodika, panaši į neseniai aprašytą naudojant In-111 konjuguotą anti-PSMA antikūną, gali būti naudojama pasikartojančioms ir metastazinėms prostatos karcinomoms nustatyti (Sodee et al., *Clin. Nuc. Med.* 21: 759-766, 1997).

Šio išradimo RG1 antikūnai gali būti žymimi detektuojamais markeriais arba konjuguojami su kita molekule, tokia kaip citotoksinis agentas, ir naudojami šios molekulės įvedimui į RG1 atžvilgiu teigiamas ląsteles (Vitetta, E.S. et al., *Immunotoxin Therapy*, in DeVita, Jr, V.T. et al., eds, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993). Citotoksinių agentų pavyzdžiais yra, bet jais neapsiribojama, ricinas, doksorubicinas, daunorubicinas, taksolis, etidio bromidas, mitomicinas, etopozidas, tenopozidas, vinkristinas, vinblastinas, koldihidroksiantracindionas, aktinomicinas D, difterijos toksinas, Pseudomonas egzotoksinas (PE) A, PE40, abrinas ir gliukokortikoidiniai bei kiti chemoterapiniai agentai, o taip pat radioizotopai. Tinkamais detektuojamais markeriais yra, bet jais neapsiribojama, radioizotopas, fluorescuojantis junginys, bioluminescuojantis junginys, chemiluminescuojantis junginys, metalo kompleksonas arba fermentas. Tinkamais radioizotopais yra tokie: stibis-124, stibis-125, arsenas-74, baris-

103, baris-140, berilis-7, bismutas-j206, bismutas-207, kadmis-109, kadmis-115m, kalcis-45, ceris-139, ceris-141, ceris-144, cezis-137, chromas-51, kobaltas-56, kobaltas-57, kobaltas-58, kobaltas-60, kobaltas-64, erbis-169, europis-152, gadolinis-153, auksas-195, auksas-199, hafnis-175, hafnis-181, indis-11, jodas-123, jodas-131, iridis-192, geležis-55, geležis-59, kriptonas-85, švinas-210, manganas-54, gyvsidabris-197, gyvsidabris-203, molibdenas-99, neodimis-147, neptunis-237, nikelis-63, niobis-95, osmis-185+191, paladis-103, platina-195m, prazeodimis-143, prometis-147, protaktinis-233, radis-226, renis-186, rubidis-86, rutenis-103, rutenis-106, skandis-44, skandis-46, selenas-75, sidabras-110m, sidabras-11, natris-22, stroncis-85, stroncis-89, stroncis-90, siera-35, tantalas-182, technecis-99m, telūras-125, telūras-132, talis-170, talis-207, toris-228, toris-232, alavas-113, titanas-44, volframas-185, vanadis-48, vanadis-49, iterbis-169, itris-88, itris-90, itris-91, cinkas-65 ir cirkonis-95.

Prostatos vėžio imunoterapija

Šiame išradime yra pateikiami įvairūs imunoterapiniai būdai prostatos vėžiui gydyti, įskaitant antikūnų terapiją, *in vivo* vakcinas ir *ex vivo* imunoterapines strategijas. Vienoje strategijoje išradime pateikiami RG1 antikūnai, kurie gali būti naudojami sistemiškai prostatos vėžiui gydyti. Pavyzdžiui, nekonjuguoti RG1 antikūnai gali būti įvesti pacientui taip, kad antikūnas susirįštų su RG1 arba asocijuotųsi su prostatos vėžio ląstelėmis ir tarpininkautų vėžinių ląstelių destruktijoje pagal mechanizmus, kurie apima komplementiška tarpininkaujamą citolizę, nuo antikūnų priklausantį ląstelinį citotoksiškumą, RG1 fiziologinės funkcijos pakeitimą ir/arba ligando surišimo inhibavimą bei signalo perdavimo kelius. RG1 antikūnai, konjuguoti su toksiniais agentais, tokiais kaip ricinas arba radioizotopai, taip pat gali būti naudojami terapiniam toksinio agento padavimui tiesiogiai į RG1 turinčias prostatos auglio ląsteles ir tokiu būdu jas suardydami.

Prostatos vėžio imunoterapijoje naudojant RG1 antikūnus galima vadovautis patarimais, atsirandančiais iš įvairių strategijų, kurios buvo sėkmingai naudojamos kitų vėžio tipų gydymui, įskaitant, bet neapsiribojant, gaubtinės žarnos vėžį (Arlen et al., *Crit. Rev. Immunol.* 18: 133-138, 1998), daugybinių mielomą (Ozaki et al., *Blood* 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari et

al., *Blood* 90: 2437-2444, 1997), skrandžio vėžį (Kasprzyk et al., *Cancer Res.* 52: 2771-2776, 1992), B-ląstelių limfomą (Funakoshi et al., *Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19: 93-101, 1996), leukemiją (Zhong et al., *Leuk. Res.* 20: 581-589, 1996), gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžį (Moun et al., *Cancer Res.* 54:6160-6166, 1994; Velders et al., *Cancer Res.* 55: 4398-4403, 1995) ir krūties vėžį (Shepard et al., *J. Clin. Immunol.* 11: 117-127, 1991).

Šiame išradime taip pat yra pateikiamos vakcinos, sukomponuotos taip, kad jose būtų RG1 polipeptido arba jo fragmentų. Specialistams yra gerai žinomas auglio antigeno panaudojimas vakcinoje humoralinio ir ląstelių tarpininkaujamo imuniškumo sukėlimui, naudojamam priešvėžinėje terapijoje, ir jis buvo panaudotas prostatos vėžio atveju, naudojant žmogaus PSMA ir graužikų imunogenus (Hodge et al., *Int. J. Cancer* 63: 231-237, 1995; Fong et al., *J. Immunol.* 159: 3113-3117, 1997). Tokie būdai gali būti nesunkiai praktikuojami naudojant RG1 polipeptidą arba jo fragmentus, arba RG1 koduojančias nukleorūgščių molekules ir rekombinantinius vektorius, galinčius ekspresuoti ir atitinkamai pateikti RG1 imunogeną.

Pavyzdžiui, RG1 koduojančios nukleorūgšties padavimui gali būti naudojamos virusinio geno padavimo sistemos. Įvairios virusinio geno padavimo sistemos, kurios gali būti naudojamos praktikoje šiuo išradimo aspektu, yra, bet jomis neapsiribojama, vakcinia virusai, naminių paukščių raupų virusai, kanarėlių raupų virusai, adenovirusai, gripo virusai, poliovirusai, adeno-asocijuoti virusai, lentivirusai ir sindbus virusai (Restifo, in *Curr. Opin. Immunol.* 8: 658-663, 1996). Taip pat gali būti taikomos nevirusinės padavimo sistemos, įvedimui į pacientą naudojant gryną RG1 polipeptidą koduojančią DNR arba jos fragmentą (pvz. suleidžiant į raumenis) priešvėžiniam atsakui sukelti. Viename įgyvendinimo variante gali būti naudojama pilno ilgio žmogaus *rg1* kDNR. Kitame įgyvendinimo variante gali būti naudojami žmogaus *rg1* kDNR fragmentai. Kitame įgyvendinimo variante gali būti naudojami *rg1* nukleorūgščių molekules, koduojančios specifinius T limfocitų (CTL) epitopus. CTL epitopai gali būti nustatyti naudojant tam tikrus algoritmus (pvz. Epimer, Brown University) peptidams, kurie gali optimaliai susirišti su specifikuotomis HLA alelėmis, RG1 polipeptide identifikuoti.

Taip pat gali būti naudojamos įvairios *ex vivo* strategijos. Viena strategija yra dendritinių ląstelių panaudojimas RG1 polipeptidui, kaip

antigenai, pateikti į paciento imuninę sistemą. Dendritinės ląstelės ekspresuoja I ir II klasės MCL, B7 kostimuliatorių ir IL-2 ir todėl yra labai specializuotos antigeną pateikiančios ląstelės. Prostatos vėžio atveju autologinės dendritinės ląstelės, paduodamos su prostatai specifinių membraninių antigenų peptidais (PSMA), yra naudojamos I fazės klinikiniuose tyrimuose prostatos vėžiu sergančių pacientų imuninei sistemai stimuliuoti (Tjoa et al., *Prostate* 28: 65-69, 1996; Murphy et al., *Prostate* 29: 371-380, 1996). Dendritinės ląstelės gali būti naudojamos RG1 polipeptidams pateikti į T ląsteles I ir II klasės MCH kontekste. Viena gyvendinimo variante autologinės dendritinės ląstelės yra paduodamos su RG1 polipeptidais, galinčiais susirišti su MHC molekulėmis. Kitame gyvendinimo variante dendritinės ląstelės yra paduodamos su pilnu RG1 polipeptidu. Dar kitas gyvendinimo variantas apima rg1 geno padidintos ekspresijos sukūrimą dendritinėse ląstelėse, naudojant įvairius specialistams žinomus implementinius vektorius, tokius kaip adenovirusas (Arthur et al., *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25, 1997), retrovirusas (Henderson et al., *Cancer Res.* 56: 3763-3770, 1996), lentivirusas, adeno-asocijuotas virusas, DNR transfekcija (Ribas et al., *Cancer Res.* 57: 2865-2869, 1997) ir iš auglio išvestos RNR transfekcija (Ashley et al., *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182, 1997).

Anti-idiotipiniai anti-RG1 antikūnai taip pat gali būti naudojami priešvėžinėje terapijoje kaip vakcina imuniniam atsakui į RG1 polipeptidą ekspresuojančias ląsteles sukelti. Tiksliau sakant, anti-idiotipinių antikūnų generavimas yra gerai žinomas specialistams ir gali būti nesunkiai pritaikytas anti-idiotipiniams anti-RG1 antikūnams, kurie imituoja epitopą RG1 polipeptide, generuoti (žr. pavyzdžiui, Wagner et al., *Hybridoma* 16: 33-40, 1997; Foon et al., *J. Clin. Invest.* 96: 334-342, 1995; Herlyn et al., *Cancer Immunol Immunother.* 43: 65-76, 1996). Toks anti-idiotipinis antikūnas gali būti naudojamas anti-idiotipinėje terapijoje kaip dabar praktikuojama su kitais nukreiptais prieš auglio antigenus anti-idiotipiniais antikūnais.

Genetinės imunizacijos metodai gali būti naudojami generuoti profilaktiniam arba terapiniam ląsteliniam imuniniam atsakui, nukreiptam prieš RG1 ekspresuojančias vėžines ląsteles. Naudojant čia aprašytas RG1 koduojančias DNR molekules, konstruktai, turintys savyje RG1 polipeptidą/imunogeną koduojančią DNR, ir atitinkamas reguliatorines sekas,

gali būti tiesiogiai suleisti į individo raumenis arba odą, taip, kad raumens arba odos ląstelės pasiimtų konstrukta ir ekspresuotų užkoduotą RG1 polipeptidą/imunogeną. RG1 polipeptidas/imunogenas gali būti ekspresuojamas kaip ląstelės paviršiaus polipeptidas arba išskiriamas peptidas. RG1 polipeptido/imunogeno ekspresija sukelia profilaktinį arba terapinį humoralinį ir ląstelinį imunitetą prieš prostatos vėžį. Gali būti naudojami įvairūs specialistams žinomi profilaktinės ir terapinės genetinės imunizacijos būdai (apie apžvalgas žr. informaciją ir publikuotus literatūros šaltinius interneto adresu www.genweb.com).

Antiprasminiai oligonukleotidai, antiprasminiai vektoriai ir ribozimai

Antiprasminiai polinukleotidai, komplementarūs *rg1*, gali būti pagaminami sintetiniu būdu. Tokie oligonukleotidai gali būti paduodami į ląsteles be lipidų arba su lipidais, kurie gali padėti antiprasminiams oligonukleotidams patekti į ląsteles.

Kitu atveju, taip pat gali būti naudojami iš retrovirusų, adenovirusų, herpeso arba vaccinia virusų arba iš įvairių bakterinių plazmidžių išvesti vektoriai rekombinantinių vektorių, kurie ekspresuos antiprasminį *rg1*, konstravimui ir padavimui. Žr. pavyzdžiui, Sambrook et al (supra) ir Ausubal et al. (supra) aprašytas metodikas.

Polinukleotidai, turintys pilno ilgio kDNR seką ir/arba jos reguliacinius elementus, duoda galimybę tyrinėtojams naudoti *rg1* polinukleotidus kaip tyrimo priemonę prasminėms grandinėms (Yousoufian and Lodish, *Mol. Cell. Biol.* 13: 98-104, 1993) arba antiprasminėms grandinėms (Eguchi et al., *Annu. Rev. Biochem.* 60: 631-652, 1991) ir genų funkcijai reguliuoti. Tokia technologija dabar yra gerai žinoma ir prasminiai arba antiprasminiai oligomerai arba didesni fragmentai gali būti suprojektuojami iš įvairių padėčių koduojančiose arba kontrolinėse srityse.

RG1 koduojantys genai gali būti išjungti transfekuojuant ląstelę arba audinį ekspresijos vektoriais, kurie ekspresuoja didelius kiekius norimo *rg1* polinukleotido fragmento. Tokie konstrukta gali užtvindyti ląsteles netransliuojamomis prasminėmis arba antiprasminėmis sekomis. Netgi nesant integracijos į DNR, tokie vektoriai gali tęsti RNR molekulių transkripciją tol, kol endogeninės nukleazės padarys netinkamas visas kopijas. Pereinamoji

ekspresija gali tęstis mėnesį arba daugiau su nereplikuojančiu vektoriumi ir netgi ilgiau, jeigu atitinkami replikacijos elementai yra vektoriaus sistemos dalis.

Kaip aukščiau minėta, genų ekspresija gali būti modifikuojama įvedant antiprasmines molekules, DNR arba RNR, į *rg1* kontrolines sritis, t.y. promotorius, stiprintojus ir intronus. Tinkamiausi yra iš transkripcijos iniciacijos vietos išvesti oligonukleotidai, pvz. tarp -10 ir +10 lyderinės sekos sričių. Antiprasminės molekulės taip pat gali būti sukurtos mRNR translacijai blokuoti, neleidžiant susidaryti transkripto ryšiui su ribosmomis. Panašiu būdu inhibavimas gali būti gaunamas naudojant "trigubos spiralės" bazių susiporavimo metodologiją. Trispiralinis susiporavimas stato į pavojų dvigubos spiralės sugebėjimą pakankamai atsiverti, kad galėtų susijungti su polimerazėmis, transkripcijos faktoriais arba reguliacinėmis molekulėmis. Nesenus terapinius pasiekimus, naudojant trigubas DNR, apžvelgė Gee, J.E. et al. (in Huber and Car, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt, Kisco, N.Y., 1994).

Ribozimai yra fermentinės RNR molekulės, galinčios katalizuoti specifinį RNR skaldymą (JAV patentas Nr.4,987,071; WO 93/23057). Ribozimų veikimo mechanizmas apima sekai specifinę ribozimo molekulės hibridizaciją su komplementaria tiksline RNR, po to endonukleolitinį skaldymą. Šis išradimas apima sukūrimą plaktuko galvos tipo ribozimo molekulių, kurios gali specifiskai ir efektyviai katalizuoti RG1 koduojančios RNR atskėlimą. Specifinės ribozimo skaldymo vietos bet kokio potencialaus RNR taikinio viduje yra iš pradžių identifikuojamos, skanuojant tikslinę molekulę ribozimo skadomoms vietoms surasti, kurioje yra tokios sekos, GUA, GUU ir GUC. Identifikavus, trumpos RNR sekos tarp 15 ir 20 ribonukleotidų, atitinkančios skaldymo vietas turinčias tikslinio geno sritis, gali būti įvertintos pagal antrines struktūrinės ypatybes, kurios padaro oligonukleotidą neoperabiliu. Kandidatinių taikinių tinkamumas taip pat gali būti įvertintas nustatant sugebėjimą hibridizuotis su komplementariais oligonukleotidais, naudojant ribonukleazės apsaugos testus (Irie et al., *Advance. Pharmacol.* 40: 207-257, 1997).

Šio išradimo antiprasminės molekulės ir ribozimai gali būti pagaminami bet kokiais specialistams žinomais RNR molekulių sintezės būdais. Tokiais

būdais yra oligotidų cheminė sintezė, tokia kaip kietafazė fosforamiditinė cheminė sintezė. Kitu atveju, RNR molekulės gali būti generuojamos *in vitro* ir *in vivo* transkripcijos būdu arba panaudojant RG1 koduojančias DNR sekas. Tokios DNR sekos gali būti įterpiamos į įvairiausių vektorių su tinkamais RNR polimerazės promotoriais, tokiais kaip T7 arba SP6. Kitu atveju, antiprasminiai kDNR konstruktai, kurie sintezuoja RNR konstitutyviai arba induktyviai, gali būti įvedami į ląstelių linijas, ląsteles arba audinius.

RNR molekulės gali būti modifikuojamos intraląsteliniam stabilumui ir gyvavimo puslaidiui padidinti. Galimos modifikacijos yra, bet jomis neapsiribojama, šoninių sekų pridėjimas molekulės 5' ir 3' galuose arba fosforotioatinio arba 2' O-metilo, o ne fosfodiesterazės, ryšių panaudojimas molekulės karkase. Padidintas stabilumas taip pat gali būti pasiekiamas įvedant netransliacines bazines, tokias kaip inozinas ir kveozinas, o taip pat acetil-, metil-, tio- ir panašiai modifikuotas adenino, citidino, guanino, timino ir uridino formas, kurių lengvai neatpažįsta endogeninės endonukleazės.

Antiprasminių vektorių įvedimo į ląsteles arba audinius metodai apima aukščiau aptartus metodus ir jie yra vienodai tinkami *in vivo*, *in vitro* ir *ex vivo* terapijoje. *Ex vivo* terapijoje antiprasminiai vektoriai yra įvedami iš paciento paimtas ląsteles ir klonų būdu pagausintas autologiniam transplantavimui vėl tam pačiam pacientui, kaip pateikta JAV patentuose Nr. Nr. 5,399,493 ir 5,437,994, čia duotuose kaip literatūros šaltiniai. Įvedimas transfekcijos būdu arba liposomų arba kitų lipidinių ir nelipidinių agentų pagrindu yra gerai žinomas specialistams.

Agentų, susirišančių su RG1, identifikavimo testai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su testais ir būdais, kurie gali būti naudojami agentams, kuri rišasi su RG1, identifiukuoti. Konkrečiau, agentai, kurie rišasi su RG1, gali būti identifiukuojami pagal RG1 ligando arba kito agento, arba sudedamosios dalies gebą susijungti su RG1 ir/arba RG1 aktyvumo inhibavimo/stimuliavimo gebą.

Kitu atveju, agentai, kurie rišasi su RG1 polipeptidu, gali būti identifiukuojami naudojant mielių dvihibridinę sistemą arba ryšio sulaikymo testą. Mielų dvihibridinėje sistemoje į mielių ląstelę yra įvedamas ir joje ekspresuojamas ekspresijos vienetas, koduojantis vieną subvienetą, sudarytą

iš dviejų transkripcijos faktoriaus subvienetų ir RG1 polipeptido. Ląstelė yra toliau modifikuojama, kad joje būtų (1) ekspresijos vienetas, koduojantis detektuojamą žymę, kurios ekspresijai reikia dviejų transkripcijos faktorių ekspresijai, ir (2) ekspresijos vienetas, koduojantis sulietą baltymą, sudarytą iš antro transkripcijos faktoriaus subvieneto ir klonuoto DNR segmento. Jeigu klonuotas DNR segmentas koduoja baltymą, kuris rišasi su RG1 polipeptidu, ekspresijoje stebima sąveika tarp RG1 ir koduojamo baltymo. Tai glaudžiai suartina abu transkripcijos faktorius ir atstatomas transkripcijos faktorius. Tai duoda detektuojamos žymės ekspresiją. Mielių dvihibridinė sistema yra ypatingai naudinga kDNR koduojančių segmentų RG1 partneriams surišti su ląstelėmis bibliotekos atrinkimui.

RG1 polipeptidai, kuri gali būti naudojami aukščiau aprašytuose testuose apima, bet neapsiriboja, išskirtą RG1 polipeptidą, RG1 polipeptido fragmentą, ląstelę, kuri buvo pakeista taip, kad ekspresuotų RG1 polipeptidą, arba ląstelės dalį, kuri buvo pakeista taip, kad ekspresuotų RG1 polipeptidą. Be to, RG1 polipeptidas gali būti pilnas polipeptidas arba tam tikras RG1 polipeptido fragmentas. Specialistai turėtų suprasti, kad jeigu RG1 polipeptidas gali būti naudojamas kokiam nors susirišimo su agentu testui, pvz. pagal molekulinės masės arba aktyvumo pokytį, gali būti naudojamas ir toks testas.

Būdas, naudojamas nustatyti, ar agentas/ląstelės komponentas rišasi su RG1 polipeptidu, bus paremtas pirmiausia naudojamu RG1 polipeptido prigimtimi. Pavyzdžiui, sulėtinimo gelyje testas gali būti naudojamas nustatyti, ar agentas rišasi su RG1, ar su jo fragmentu. Kitu atveju, imunodetekcijos ir biočipų technologijos gali būti pritaikytos naudoti su RG1 polipeptidu. Įgudęs specialistas gali nesunkiai naudoti įvairias žinomas metodikas nustatant, ar tam tikras agentas rišasi su RG1 polipeptidu.

Be to, gali būti nustatoma agentų ir ląstelių komponentų sugebėjimas moduluoti RG1 polipeptido aktyvumą, naudojant neląstelinę testavimo sistemą arba ląstelinę testavimo sistemą. Kadangi RG1 polipeptido aktyvumas pasidarė labiau apibrėžtas, gali būti naudojami funkciniai testai, paremti identifikuotu aktyvumu.

Čia laikoma, kad agentas antagonizuoja RG1 aktyvumą tada, kai agentas sumažina RG1 aktyvumą. Tinkamiausias antagonistas selektyviai

antagonizuos RG1, neveikdamas kitų ląstelių baltymų. Be to, tinkamiausias antagonistas turėtų sumažinti RG1 aktyvumą daugiau nei 50 %, geriau daugiau nei 90 %, o visų geriausia, jeigu jį iš vis eliminuotų.

Aukščiau aprašytame būde išbandomi agentai gali būti atsitiktinai parinkti arba racionaliai parinkti, arba suprojektuoti. Čia yra laikoma, kad agentas yra atsitiktinai parinktas, jeigu šis agentas yra parinktas atsitiktinai, nenagrinėjant specifinių RG1 polipeptido sekų. Atsitiktinai parinktų agentų pavyzdys yra cheminės bibliotekos arba peptidų kombinatorinės bibliotekos panaudojimas, arba organizmo auginimo terpės arba augalo ekstrakto panaudojimas.

Čia yra laikoma, kad agentas buvo racionaliai parinktas arba suprojektuotas, jeigu agentas yra parinktas neatsitiktiniu pagrindu, ir yra nagrinėjamos tikslinių vietų sekos ir/arba jo konformacija sąryšyje su agento veikimu. Agentai gali būti racionaliai parinkti arba racionaliai suprojektuoti naudojant peptidų sekas, kurios sudaro RG1 polipeptidą. Pavyzdžiui, racionaliai parinktas peptidinis agentas gali būti peptidas, kurio aminorūgščių seka yra identiška RG1 polipeptido fragmentui.

Šio išradimo būduose testuojami agentai gali būti, pavyzdžiui, peptidai, antikūnai, oligonukleotidai, mažos molekulės ir vitaminų dariniai, o taip pat angliavandeniai. Specialistas nesunkiai supras, kad šiame atrinkimo būde naudojamiems agentams nėra struktūrinių ir prigimties apribojimų. Viena šio išradimo agentų klasė yra peptidiniai agentai, kurių aminorūgščių sekos yra pasirinktos remiantis RG1 polipeptido aminorūgščių seka.

Peptidiniai agentai gali būti pagaminti naudojant standartinius kietafazės (arba tirpalo fazės) peptidų sintezės metodus, kurie yra žinomi. Be to, šiuos peptidus koduojanti DNR gali būti sintezuota naudojant prekybinę oligonukleotidų sintezės įrangą ir gaunama rekombinantiniu metodu, naudojant standartines rekombinantinio produkavimo sistemas. Kietafazę peptidų sintezę būtina naudoti tada, kai reikia įvesti geno nekoduojamas aminorūgštis.

Kita šio išradimo agentų klasė yra antikūnai, kurie imunoreaguoja su kritinėmis RG1 polipeptido padėtimis. Kaip aprašyta aukščiau, antikūnai yra gaunami imunizuojant tinkamus žinduolius peptidais, kaip antigenines sritis turinčiais tokias RG1 polipeptido dalis, kurios yra numatomos būti antikūno

taikiniai. Tokie agentai gali būti naudojami konkurencinio surišimo tyrimams, norint identifikuoti antros kartos inhibicinius agentus, o taip pat ir RG1 aktyvumui blokuoti.

Šio išradimo būduose tiriami ląstelių ekstraktai gali būti, pavyzdžiui, ląstelių arba audinių vandeniniai ekstraktai, organiniai ląstelių arba audinių ekstraktai arba dalinai išgrynintos ląstelių frakcijos. Specialistas supras, kad naudojamame šio išradimo atrinkimo būde ląstelių ekstraktų šaltiniams nėra jokių apribojimų.

Agentai, kurie rišasi su RG1 polipeptidu, tokie kaip RG1 antikūnas, gali būti naudojami RG1 aktyvumui moduluoti, nukreipiant priešvėžinius agentus į atitinkamas žinduolio ląsteles, arba agentams, kurie blokuoja sąveiką su RG1, identifikuoti. RG1 ekspresuojančios ląstelės gali būti naudojamos tokių agentų taikiniu arba jos gali būti identifikuojamos, naudojant agentą, kuris rišasi su RG1.

Kaip RG1 rišantys agentai bus naudojami priklauso nuo RG1 rišančio agento prigimties. Pavyzdžiui, RG1 rišantis agentas gali būti naudojamas: konjuguotiems toksinams, tokiems kaip diferito toksinas, choleros toksinas, ricinas arba pseudomonas egzotoksinas, pateikti į RG1 ekspresuojančią ląstelę; RG1 aktyvumui moduluoti; tiesioginiam RG1 ekspresuojančios ląstelės sunaikinimui; arba konkurenciškai susirišantiems agentams atrinkti. Pavyzdžiui, RG1 inhibicinis agentas gali būti naudojamas tiesioginiam RG1 ekspresuojančių ląstelių augimo inhibavimui, o RG1 rišantis agentas gali būti naudojamas kaip diagnostinis agentas.

Farmacinės kompozicijos ir vartojimas

Šis išradimas taip pat yra susijęs su farmacinėmis kompozicijomis, į kurias gali įeiti *rg1* polinukleotidai, RG1 polipeptidai, antikūnai, agonistai, antagonistai arba inhibitoriai, vieni arba derinyje su bent vienu kitu agentu, tokiu kaip stabilizuojantis junginys, kurios gali būti vartojamos bet kokiame steriliame, biosuderinamame farmaciniame nešiklyje, įskaitant, bet neapsiribojant, fiziologinį tirpalą, buferintą fiziologinį tirpalą, dekstrozę ir vandenį. Bet kuri iš šių molekulių gali būti skiriama pacientui viena arba derinyje su kitais agentais, vaistais arba hormonais, farmacinėse kompozicijose, kuriose ji yra sumaišyta su pagalbinėmis medžiagomis arba

farmaciškai priimtinais nešikliais. Viename šio išradimo įgyvendinimo variante farmaciškai priimtinas nešiklis yra farmaciškai inertiškas.

Šis išradimas taip pat yra susijęs su farmacinių kompozicijų vartojimu. Jų vartojimas yra peroralinis arba parenterinis. Parenterinio įvedimo būdai apima vietinį, intraarterinį (tiesiog į auglį), intraraumeninį, poodinį, intrameduliarinį, į nugaros smegenų dangalo vidų, intraventrikulinį, intraveninį, intraperitoninį arba intranazalinį vartojimą. Apart veikliųjų ingredientų, šiose farmacinėse kompozicijose gali būti tinkamų farmaciškai priimtinių nešiklių, apimančių papildomas ir pagalbines medžiagas, kurios palengvina veikliųjų medžiagų pavertimą preparatais, kurie gali būti naudojami farmacijoje priimtu būdu. Kitos detalės apie sukomponavimo ir vartojimo metodikas gali būti rastos paskiausiam Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co., Easton, Pa) leidinyje.

Farmacinės kompozicijos peroraliniam vartojimui gali būti paruošiamos, naudojant specialistams gerai žinomus farmaciškai priimtinus nešiklius, peroraliniam vartojimui tinkamomis dozėmis. Tokie nešikliai duoda galimybę farmacinę kompoziciją paversti vaisto forma, tokia kaip tabletės, piliulės, žirneliai, kapsulės, skysčiai, geliai, sirupai, suspensijos ir panašios, kurias pacientas turi nuryti.

Farmaciniai preparatai peroraliniam vartojimui gali būti gauti sumaišant veikliuosius junginius su kietomis pagalbėmis medžiagomis, esant reikalui, malant gautą mišinį ir paverčiant gautą granulių mišinį, pridėjus tinkamų papildomų medžiagų, jeigu pageidautina, į tabletes arba žirnelių šerdis. Tinkamomis pagalbėmis medžiagomis yra angliavandenių arba baltymų tipo užpildai, tokie kaip cukrai, įskaitant laktozę, sacharozę, manitolį arba sorbitolį; krakmolai iš kukurūzų, kviečių, ryžių, bulvių arba kitų augalų; celiuliozė, tokia kaip metilceliuliozė, hidroksipropilmetilceliuliozė arba natrio karboksimetilceliuliozė; ir dervos, įskaitant gumiarabiką ir tragakantą; bei baltymai, tokie kaip želatina ir kolagenas. Jeigu pageidaujama, gali būti pridėdama dezintegrantų arba soliubilizuojančių agentų, tokių kaip susiūtas polivinilpirolidonas, agaras, algino rūgštis arba jos druskos, kaip antai natrio alginatas.

Žirnelių šerdys yra pateikiamos tinkamai padengtos, pavyzdžiui, koncentruotais cukrų tirpalais, kuriuose gali būti gumiarabiko, talko,

polivinilpirolidono, karbopolgelio, polietilenglikolio ir/arba titano dioksido, lakų tirpalų ir tinkamų organinių tirpiklių arba tirpiklių mišinių. Į tabletes arba žirnelių dangas gali būti pridėta dažų arba pigmentų produkto identifikacijai arba veikliojo junginio, t.y. dozės kiekiui apibūdinti.

Peroraliniu būdu vartojami farmaciniai preparatai gali būti iš želatinos padarytos sustumiamos kapsulės, taip pat minkštos užlydytos kapsulės, padarytos iš želatinos ir padengtos gliceroliu arba sorbitoliu. Sustumiamose kapsulėse gali būti veiklieji ingredientai sumaišyti su užpildais arba rišikliais, tokiais kaip laktozė arba krakmolos, tepalais, tokiais kaip talkas arba magnio stearatas, ir esant reikalui, stabilizatoriais. Minkštose kapsulėse veiklieji junginiai gali būti ištirpinti arba suspenduoti tinkamuose skysčiuose, tokiuose kaip riebaliniai aliejai, skystas parafinas arba skystas polietilenglikolis su arba be stabilizatorių.

Farmacinės kompozicijos parenteriniam vartojimui apima veikliųjų junginių vandeninius tirpalus. Injekcijoms šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti paruošiamos vandeniniuose tirpaluose, geriausia fiziologiniuose suderinamuose buferiuose, tokiuose kaip Hank'o tirpalas, Ringer'io tirpalas arba fiziologinis buferintas tirpalas. Vandeninėse injekcijų suspensijose gali būti medžiagų, kurios didina suspensijos klampumą, tokių kaip natrio karboksimetilceliuliozė, sorbitolis arba dekstranas. Be to, veikliųjų junginių suspensijos gali būti pagaminamos kaip tinkamos suspensijos aliejuose. Tinkamais lipofiliniais tirpikliais arba skiedikliais yra riebaliniai aliejai, tokie kaip sezamo aliejus, arba sintetinių riebalų rūgščių esteriai, tokie kaip etiloleatas arba trigliceridai, arba liposomos. Esant reikalui, suspensijose gali būti tinkamų stabilizatorių arba agentų, kurie didina junginių tirpumą, kad būtų galima paruošti labai koncentruotus tirpalus.

Vietiniam arba nazaliniam vartojimui kompozicijose yra naudojami skvarbikliai, turintys tinkamą prasiskverbimo barjerą. Tokie skvarbikliai paprastai yra žinomi specialistams.

Rinkiniai

Šis išradimas taip pat yra susijęs su farmaciniais paketais ir rinkiniais, turinčiais vieną arba daugiau talpų, užpildytų vienu arba daugiau aukščiau minėtų šio išradimo kompozicijų ingredientų. Kartu su tokiomis talpomis gali

būti raštelis su valstybinės agentūros, reguliuojančios vaistų arba biologinių produktų gamybą, panaudojimą ir prekybą, nurodymais, kuriame atsispindi agentūros pritarimas šio produkto gamybai, panaudojimui ir prekybai dėl jo vartojimo žmonėms.

Gamyba ir laikymas

Šio išradimo farmacinės kompozicijos gali būti gaminamos specialistams žinomu būdu, t.y. panaudojant įprastus, sumaišymo, ištirpinimo, granuliavimo, žirnelių gaminimo, sutrynimo į miltelius, emulgavimo, įkapsuliavimo, įterpimo arba liofilizavimo procesus.

Farmacinės kompozicijos gali būti pateikiamos druskos pavidalu ir gali būti sudarytos su daugeliu rūgščių, įskaitant, bet neapsiribojant, hidrochlorido, sulfato, acto, pieno, vyno, obuolių, gintaro rūgštis ir t.t. Druskos yra labiau linkę tirpti vandeniniuose arba kituose protoniniuose tirpikliuose, nei atitinkamos laisvos bazės formos. Kitais atvejais tinkamiausias preparatas gali būti liofilizuoti milteliai 1 mM-50 mM histidino, 0,1 % -2 % sacharozės, 2 % - 7% manitolio tirpale, kurio pH 4,5-5,5, kurie prieš vartojimą sumaišomi su buferiu.

Po to, kai pagaminama šio išradimo junginio turinti farmacinė kompozicija priimtina nešiklyje, ji gali būti sudedama į atitinkamą talpą ir uždedama etiketė su nuoroda, kokiai būklei gydyti ji yra skirta. RG1 vartojimo atveju tokioje nuorodoje turi būti kiekis, dažnis ir vartojimo būdas.

Terapiškai efektyvi dozė

Farmacinės kompozicijos, tinkamos naudoti šiame išradime, apima kompozicijas, kuriose veikliųjų ingredientų kiekis sudaro efektyvų kiekį numatomam tikslui pasiekti, t.y. konkrečiai ligos būklei, kuriai yra būdinga RG1 ekspresija, gydyti. Efektyvios dozės nustatymas yra gerai žinomas specialistams.

Bet kokiam junginiui efektyvi dozė gali būti įvertinta iš pradžių arba iš ląstelių kultūrų testų, pvz., neoplazinių ląstelių, arba gyvūnų modeliuose, naudojant peles, triušius, šunis arba kiaules. Gyvūnų modelis taip pat yra naudojamas kai reikia pasiekti pageidaujamą koncentracijų intervalą ir

nustatyti vartojimo būdą. Tokia informacija tada gali būti naudinga nustatant tinkamas dozes ir vartojimo būdą žmonėms.

Terapiškai efektyvi dozė reiškia tokį baltymo arba jo antikūnų, antagonistų arba inhibitorių kiekį, kuris pagerina simptomus arba būklę. Tokių junginių terapinis efektyvumas ir toksiškumas gali būti nustatytas pagal standartines farmacines metodikas bandymuose su ląstelių kultūromis arba eksperimentiniais gyvūnais, pvz. ED₅₀ (terapiškai efektyvi dozė 50 % populiacijos) ir LD₅₀ (letalinė dozė 50 % populiacijos). Terapinių ir toksinių efektų dozių santykis yra terapinis indeksas ir gali būti išreiškiamas kaip ED₅₀/LD₅₀ santykis. Tinkamiausios yra farmacinės kompozicijos, kurios turi didelius terapinius indeksus. Duomenys, gauti iš ląstelių kultūrų bandymų ir gyvūnų tyrimų, yra naudojami nustatant dozių intervalą naudoti žmonėms. Geriausia, kai tokių junginių dozės yra cirkuliuojančios koncentracijos, kuri apima ED₅₀, ribose ir nėra arba yra labai mažas toksiškumas. Dozės keisis šiame intervale priklausomai nuo naudojamos dozuotos formos, paciento jautrumo ir vartojimo būdo.

Tikslią dozę parenka konkretus gydytojas atsižvelgdamas į gydomą pacientą. Dozės ir vartojimas yra parenkami taip, kad būtų pateikiami pakankami kiekiai veikliosios liekanos arba palaikomas norimas poveikis. Papildomi faktoriai, kurie gali būti priimami dėmesin, yra ligos būklės sunkumas, pvz. auglio dydis ir padėtis, amžius, svoris ir paciento lytis, maistas, laikas ir vartojimo dažnumas, vaistų derinys, jautrumo reakcijos ir pernešimas/atsakas į gydymą. Ilgai veikiančios farmacinės kompozicijos gali būti skiriamos kas 3-4 dienas, kas savaitę arba kartą į dvi savaites, priklausomai nuo konkrečios kompozicijos gyvavimo puslaikio ir pašalinimo greičio.

Normalios dozės gali kisti nuo 0,1 iki 100000 mikrogramų, iki maždaug 1 g bendros dozės, priklausomai nuo vartojimo būdo. Nuorodos apie konkrečias dozes ir įvedimo būdus yra pateiktos literatūroje. Žr. JAV patentus Nr. Nr. 4,657,760; 5,206,344 arba 5,225,212. Specialistai naudos skirtingas kompozicijas nukleotidams lyginant su baltymais arba jų inhibitoriais. Panašiu būdu, polinukleotidų arba polipeptidų įvedimas priklausys nuo konkrečių ląstelių, būklių, padėčių ir t.t.

Šis išradimas yra toliau aprašomas sekanciais pavyzdžiais. Pavyzdžiai yra pateikiami vien tik išradimui pailiustruoti remiantis konkrečiais įgyvendinimo variantais. Šie pavyzdžiai, nors ir iliustruoja tam tikrus specifinius išradimo aspektus, nevaizduoja aprašyto išradimo apribojimų ir neapibrėžia jo apimties.

Visi pavyzdžiai buvo įgyvendinti naudojant standartines metodikas, kurios yra gerai žinomos ir įprastos specialistams, išskyrus atvejus, kai jos aprašytos smulkiai. Šių pavyzdžių įprastos molekulinės biologijos metodikos gali būti atliekamos kaip aprašyta standartiniuose laboratoriniuose vadovėliuose, tokiuose kaip Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

1 pavyzdys: Žmogaus *rg1* polinukleotido identifikavimas

Rg1 buvo identifikuotas kaip prostatoje ekspresuotas genas rausiantis Incyte LifeSeq duomenų bazėje. Nukleotidų seka buvo identifikuota pagal anotacinę paiešką duomenų bazėje, naudojant Incyte duotą pavadinimą "baltymų funkcija" paieškos duomenų bazėje tikslais. Ši nukleotido seka buvo rasta ląstelių adhezijos molekulių kategorijoje anotacijas turinčioje duomenų bazėje ir buvo aprašyta kaip f-spondino homologas. *Rg1* polinukleotido sekos pasiskirstymo duomenų bazės bibliotekų rinkinyje elektroninė Northern'o analizė parodė, kad *rg1* yra ekspresuojamas dideliais kiekiais prostatos bibliotekose ir mažesniais kiekiais eilėje kitų audinių bibliotekų, įskaitant bibliotekas iš normalių ir iš auglio audinių.

Surinkus duomenų bazės *rg1* klonų rinkinį į gretimas polinukleotido sekas ir suredagavus gretimas sekas, buvo identifikuota pilno ilgio koduojanti seka numatytame surinktame polinukleotide. Ši seka koduoja baltymą, homologišką f-spondinui ir Mindinui-2.

Eksperimentiniam darbui buvo gauti Incyte klonai 1640796, 1712252 ir 1880265 iš Incyte, o 3360733 klonas buvo identifikuotas kaip turintis daugiausia 5'-nukleotidų sekos. Šis klonas buvo pilnai sekvenuotas ir turėjo pilną kodavimo seką numatytam RG1 baltymui. Ši seka yra parodyta fig.1 (SEQ ID NO: 1).

2 pavyzdys: RG1 mRNR ekspresija

Rg1 mRNR ekspresija daugelyje mėginių iš normalių ir auglio audinių ir ląstelių linijose buvo nustatoma pusiau kiekybine PCR, naudojant Taqman'o testą (Perkin-Elmer). Prostatos normalių audinių, gerybinio ir piktybinio auglio audinių mėginiai, kurie buvo surūšiuoti pagal modifikuotą Gleason rūšiavimo sistemą, buvo gauti iš Stanford University School of Medicine urologijos skyriaus. RNR buvo išskirta pagal standartines metodikas. RNR iš kitų auglio ir normalių audinių buvo gauta iš prekybinių šaltinių, įskaitant Clonetech ir Biochain. Prostatos auglio ląstelių linijos (PC-3, LNCap ir DU145) buvo gautos iš Amerikos tipinių kultūrų kolekcijos ir padaugintos kultūroje standartiniais metodais, naudojant serumo turinčią terpę. Iš šių ląstelių linijų išvesti ksenograftiniai augliai buvo gauti plikosiuose pelėse ir išimti iš pelių praėjus maždaug 4-6 savaitėms po implantavimo. RNR buvo išskirta iš auglių panaudojant standartines metodikas.

Taqman paremta PCR analizė buvo atliekama naudojant pradmenis: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (SEQ ID NO: 3) IR GCC GCG TCC GCA AAG (SEQ ID NO: 4) ir Taqman zondą: 6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (SEQ ID NO: 5).

Šie pradmenys ir zondas buvo suprojektuoti naudojant Perkin Elmer's primer Express programą ir susintezuoti Synthetic Genetics. PCR reakcijos buvo vykdomos 30-40 ciklų ir kiekybiškai įvertintos naudojant prostatos RNR standartinei kreivei gauti santykiniam palyginimui. Ši analizė parodė, kad *rg1* mRNR buvo aptikta didesniais kiekiais prostatoje ir daug mažesniais kiekiais keliuose kituose audiniuose (žr. fig. 5).

3 pavyzdys: RG1 klonavimas ir ekspresija BHK ląstelėse

RG1 koduojanti sritis buvo gauta iš Incyte plazmidės 3360733. Koduojanti sritis buvo pagausinta su pradmenimis SST115 (5'-TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCCGGC-3') (SEQ ID NO: 6) ir SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (SEQ ID NO: 7) standartinėje PCR reakcijoje (100 μl) naudojant 1 x Pfu Turbo

polimerazinį buferį (Stratagene, La Jolla, CA)/200 μ M dNTPS/0,2 μ M oligonukleotido pradmenų/2,5 U Pfu Turbo polimerazės (Stratagene). PCR gausinimo sąlygos buvo tokios: 3 min. 95 °C temperatūroje, (15 sekundžių 95 °C temperatūroje, 30 sekundžių 60 °C temperatūroje, 2 minutės 72 °C temperatūroje)x35, 72 °C temperatūroje 7 minutės. Gautas PCR pagausintas produktas buvo gryninamas naudojant QIAquick PCR kolonėlę (Qiagen, Valencia, CA) ir skaldomas su XbaI ir PmlI restrikcijos fermentais, gaunant 1010 bp fragmentą, kuris buvo išskirtas 1 % agarozės gelyje, naudojant BIO 101 GeneClean Kit (Vista, CA). Išgrynintas fragmentas buvo prijungtas (naudojant Epicentre Fast Link Kit, Epicenter, Madison, WI) prie necitopatinio Sindbis ekspresijos vektoriaus pSINrep21 (Agapov et al., 1998, *PNAS* 95: 12989-12994), skaldytas XbaI ir PmlI ir transformuotas į DH5 alfa imliašias ląsteles (Life Technologies, Gaithersburg, CA) ir jos atrinktos ant ampicilino turinčių (100 ug/ml) LB agaro plokštelių. Viena tokia atspari ampicilinui kolonija buvo auginta LB terpėje su ampicilinu ir panaudojus sekų analizę buvo parodyta, kad joje yra įterpta RG1 koduojanti seka. Ši plazmidė buvo pavadinta pPEG6.

Du mikrogramai pPEG6 buvo naudoti 1-3 x 10⁵ jaučio žiurkėno inkstų ląstelėms (BHK) transfekuoti, naudojant Lipofectamine Plus reagentą (Life Technologies, Gaithersburg, MD) pagal gamintojo nurodymus. Po transfekavimo ląstelės buvo inkubuojamos DMEM su fetalinio kraujo serumu 24-48 valandas; per šį laiką ląstelės suskilo 1 į 10 ir buvo pradėtas plazmidę turinčių ląstelių atrinkimas pridėdant puromicino (galutinė koncentracija 2,5ug/ml) ir DMEM turinčio serumo. Kai ląstelės pasidarė susiliejančios (praėjus 4-5 dienoms po puromicino pridėjimo), ląstelės buvo plaunamos PBS, skaldomos 1 į 10 ir pridėdama DMEM terpės su serumu ir 5 ug/ml puromicino. Praėjus dar 2-3 dienoms, terpė pakeičiama DMEM ir 5 ug/ml puromicino be serumo, auginama 2-3 dienas ir RG1 baltymo buvimas terpėje nustomas Western'o analize, naudojant RG1 antikūnus. Buvo aptikta 1 ug/ml RG1 baltymo.

4 pavyzdys: Antikūnų generavimas

Buvo sukeltas triušių polikloninis antiserumas prieš 5 sintetines polipeptido sekas, išvestas iš RG1 baltymo sekos. Šios sekos buvo parinktos dėl jų numatytos padėties baltymo paviršiuje, kad būtų generuojamas atiserumas, kuris turėtų atpažinti paviršiaus epitopus. Sintzei palengvinti cisteino liekanos buvo pakeistos aminosviesto rūgštimi (Abu). Toliau duodamos šių 5 peptidų konkrečios aminorūgščių sekos, padėtys RG1 baltyme ir jų žymėjimas.

Žymėjimas	Padėtis	Aminorūgščių seka
C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (SQQ 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)

Naudojimui imunogenu peptidai buvo kovalentiškai prijungti prie sraigės limfos hemocianino (KLH) per papildomą karboksi-galo cisteiną. Panašiu būdu buvo pagamintas jaučio serumo albumino (BSA) konjugatas antiserumo titrams analizuoti ELISA metodu.

Kiekvienu peptidu buvo imunizuoti du gyvūnai. Pradinė imunizacija buvo vykdoma Freund'o pilname adjuvante (0,5 mg/gyvūnui), po to kas tris savaites dozė buvo didinama po 0,25 mg/gyvūnui Freund'o nepilname adjuvante, suleidžiant į raumenis. Imami periodiniai kraujo mėginiai ir antikūnų titrai prieš specifinį BSA-peptido konjugatą matuojami ELISA metodu ir lyginami su serumu prieš imunizaciją. Buvo parodyta, kad antiserumai prieš 1C ir 3C peptidus yra aktyvūs. Antiserumai prieš 2C peptidą neatpažino RG1 polipeptido. Antiserumai prieš 4C ir 5C peptidus nebuvo testuoti.

Žmogaus monokloniniai antikūnai prieš RG1 buvo generuoti imunizuojant transgenines peles prieš RG1 polipeptidus ir 6-histidino tag turintį RG1 sulietą baltymą, ekspresuotą *E. coli*. Šių gyvūnų splenocitai buvo sulieti su mielomos ląstelėmis gaunant hibridomas ląsteles. Gautos hibridomos buvo atrinktos pagal ELISA analizę, atrenkant tas, kurios produkuoja antikūnus prieš RG1 peptidus ir baltymą.

5 pavyzdys: Antikūnų Western'o blotų analizė

Tirtas antiserumų RG1 specifiskumas panaudojant Western'o blotingą. RG1 specifiniai antiserumai (sukelti prieš aukščiau parodytas 1C ir 3C sekas) buvo tirti panaudojant RG1 pereinamai ekspresuotą COS ląstelėse, natyvų RG1, išskirtą iš LNCap ląstelių ir RG1, gautą iš transfekuotų žiurkėno jauniklio inkstų (BHK) ląstelių. RG1 specifiniai antiserumai toliau buvo tirti panaudojant lizatus, pagamintus iš: LNCap auglių, LNCap ląstelių, PC3 auglių, PC3 ląstelių ir kelių žmogaus prostatos auglių klinikinių pavyzdžių. Ląstelės ir augliai buvo lizuoti detergento buferyje. Pavirinus 5 minutes, 10 ul kiekvieno lizato įleidžiama į 12 % SDS-poliakrilamido gelį baltymams išskirstyti. Tada atskirti baltymai perkeliama į nitroceliuliozės membranas. RG1 antikūnų surišimo specifiskumas buvo tikrinamas esant homologinių ir heterologinių peptidų. RG1 specifiniai antiserumai galėjo aptikti baltymus visuose pavyzdžiuose, išskyrus PC-3 ląsteles ir PC-3 auglius.

6 pavyzdys: Natyvaus LNCaP ląstelių išskirto RG1 baltymo gryninimas

Western'o blotų analizės metodu buvo parodyta, kad išaugintos kultūroje LNCap ląstelės išskiria natyvų RG1 baltymą. Norint išgryninti šį natyvų baltymą, ląstelės buvo auginamos 48 valandas serumo neturinčioje terpėje. Iš šios serumo neturinčios terpės ląstelės buvo surinktos, nucentrifuguotos ir terpė sukonzentruota maždaug 50 kartų ultrafiltracijos metodu. Tada sukonzentruota terpė buvo praskesta 20 kartų 20 mM natrio acetato buferiu, pH 6,5, ir suleista į Q-sefarozės anijonito kolonėlę. Kolonėlė plaunama natrio chlorido gradientu (0,5 % per minutę), renkant 2,0 ml frakcijas. RG1 baltymas eliuuojamas esant maždaug 75 mM NaCl, kaip rodo Western'o blotingas ir SDS PAGE. Natyvus baltymas išbėga esant šiek tiek mažesnei molekulinei masei nei bakterijose ekspresuotas 6 histidin-RG1 sulietas baltymas tikriausiai todėl, kad jame nėra sulieto peptido.

7 pavyzdys: RG1 ekspresijos imunohistocheminis dažymas

Ekspresuotas RG1 baltymas buvo nustatytas LifeSpan Biosciences, Inc. įvairiausių žmogaus audiniuose, įskaitant inkstus, plaučius, kasą, raumenis, smegenis ir prostatą. Papildomi prostatos audiniai buvo gauti iš Stanford University School urologijos skyriaus ir tirti Berlekse. Audinių pjūviai buvo deparafinizuoti naudojant standartines metodikas. Kaip pirminis antikūnas buvo naudotas polikloninis antikūnas RG1-3C, o detekcijos sistema susidėjo iš Vector ABC-AP rinkinio (AK5002) su Vektor raudonojo substrato rinkiniu (Sk5002). Kaip neigiama kontrolė dažymas buvo atliekamas nesant pirminio antikūno.

* * * * *

Visos šiame aprašyme paminėtos publikacijos ir patentai čia yra pridėti kaip literatūros šaltiniai. Nors šis išradimas buvo aprašytas remiantis konkrečiais jo įgyvendinimo variantais, specialistai turėtų suprasti, kad gali būti padaryti įvairūs pakeitimai, pakeista įvairiais ekvivalentais nenukrypstant nuo išradimo esmės ir sferos. Be to, gali būti padaryta daugybė pakeitimų pritaikant konkrečiai situacijai, medžiagai, medžiagos sudėčiai, procesui, proceso stadijai arba stadijoms, šio išradimo tikslui, esmei ir sferai. Laikoma, kad visus tokius pakeitimus apima pridėdama apibrėžtis.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išskirtas polinukleotidas, apimantis polinukleotidą, kuris yra mažiausiai 70 % identiškasis nariui, pasirinktam iš grupės, susidedančios iš:

(a) polinukleotido, koduojančio polipeptidą arba jo biologiškai arba imunologiškai aktyvų fragmentą, turintį fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką;

(b) polinukleotido, koduojančio polipeptidą, kuris apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 21-331 aminorūgštis;

(c) polinukleotido, koduojančio polipeptidą, kuris apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 27-331 aminorūgštis.

(d) polinukleotido, kuris yra komplementarus (a), (b) arba (c) polinukleotidui.

2. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra DNR.

3. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra RNR.

4. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra genominė DNR.

5. Polinukleotidas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis koduoja polipeptidą, kuris apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 1-331 aminorūgštis.

6. Polinukleotidas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis koduoja polipeptidą, kuris apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 21-331 aminorūgštis.

7. Polinukleotidas pagal 2 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis koduoja polipeptidą, kuris apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 27-331 aminorūgštis.

8. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytos sekos 1-1770 nukleotidus.

9. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytos sekos 296-1291 nukleotidus.

10. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytos sekos 356-1291 nukleotidus.

11. Polinukleotidas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.1 (SEQ ID NO: 1) parodytos sekos 374-1291 nukleotidus.

12. Vektorius, turintis savyje polinukleotidą pagal 2 punktą.

13. Šeimininko ląstelė, turintį savyje vektorių pagal 12 punktą.

14. Polipeptido produkavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima polipeptido, kurį koduoja polinukleotidas, ekspresiją šeimininko ląstelėje pagal 13 punktą.

15. Būdas pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad polipeptidas apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 1-331 aminorūgštis.

16. Būdas pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad polipeptidas apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 21-331 aminorūgštis.

17. Būdas pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad polipeptidas apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 27-331 aminorūgštis.

18. Polipeptido produkavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad polipeptidas apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką ir susideda iš:

(a) šeimininko ląstelių pagal 13 punktą auginimo salygoje, kuriose yra ekspresuojamas šis polipeptidas, ir

(b) polipeptido išgavimo iš kultūros stadijų.

19. Ląstelės, kuri ekspresuoja polipeptidą, produkavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima ląstelės su vektoriumi pagal 12 punktą gavimą genų inžinerijos būdu.

20. Polipeptidas, turintis savyje narį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

(a) polipeptido arba jo biologiškai arba imunologiškai aktyvaus fragmento, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką;

(b) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 21-331 aminorūgštis;

(c) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 27-331 aminorūgštis;

(d) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 28-46 aminorūgštis;

(e) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 77-91 aminorūgštis; ir

(f) polipeptido, kuris yra mažiausiai 70 % identiškasis (a), (b), (c), (d) arba (e) polipeptidui.

21. Polipeptidas pagal 20 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 1-331 aminorūgštis.

22. Polipeptidas pagal 20 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 21-331 aminorūgštis.

23. Polipeptidas pagal 20 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis apima fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos aminorūgščių sekos 27-331 aminorūgštis.

24. Išskirtas antikūnas arba antikūno fragmentas, besiskiriantis tuo, kad jis specifiskai rišasi su polipeptidu, turinčiu savyje narį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

(a) polipeptido arba jo biologiškai arba imunologiškai aktyvaus fragmento, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką;

(b) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 28-46 aminorūgštis;

(c) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 77-91 aminorūgštis;

(d) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 188-210 aminorūgštis;

(e) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 263-274 aminorūgštis; ir

(f) polipeptido, kuris yra mažiausiai 70 % identiškias (a), (b), (c), (d) arba (e) polipeptidui.

25. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis specifiskai rišasi su aminorūgščių seka PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEQ ID NO: 8)

26. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis specifiskai rišasi su aminorūgščių seka HSSDYSMWRKNQYVS (SEQ ID NO: 10).

27. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis specifiskai rišasi su aminorūgščių seka DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEQ ID NO:11).

28. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis specifiskai rišasi su aminorūgščių seka NEIVDSASVPET (SEQ ID NO: 12).

29. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra polikloninis antikūnas.

30. Antikūnas pagal 24 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra monokloninis antikūnas.

31. Imunokonjugatas, apimantis išskirtą antikūną arba antikūno fragmentą, kuris specifiskai rišasi su polipeptidu, turinčiu savyje narį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

(a) polipeptido arba jo biologiškai arba imunologiškai aktyvaus fragmento, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką;

(b) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 21-331 aminorūgštis;

(c) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 27-331 aminorūgštis;

(d) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 28-46 aminorūgštis;

(e) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 77-91 aminorūgštis;

(f) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 188-210 aminorūgštis;

(g) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 263-274 aminorūgštis; ir

(h) polipeptido, kuris yra mažiausiai 70 % identiškasis (a), (b), (c), (d), (e), (f) arba (g) polipeptidui,

konjuguotą su terapiniu agentu.

32. Imunokonjugatas pagal 31 punktą, besiskiriantis tuo, kad terapinis agentas yra citotoksinis agentas.

33. Imunokonjugatas pagal 32 punktą, besiskiriantis tuo, kad citotoksinis agentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš ricino, doksorubicino, daunorubicino, taksolio, etidžio bromido, mitomicino, etopozido, tenopozido, vinkristino, vinblastino, kolchicino, dihidroksiantracindiono, aktinomicino D, difterijos toksino, *Pseudomonas* egzotoksino (PE) A, PE40, ricino, abirino, gliukokortikoido ir radioizotopų.

34. Imunokonjugatas pagal 31 punktą, besiskiriantis tuo, kad antikūno fragmentas yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš Fv, F(ab') ir F(ab')₂ fragmentų.

35. Selektivaus fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą polipeptidą ekspresuojančios ląstelės suardymo būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima

imunokonjugato pagal 31 punktą sąveiką su ląstele taip, kad imunokonjugato terapinis agentas gali suardyti ląstelę.

36. Imunokonjugatas pagal 31 punktą terapiškai efektyviame kiekyje, skirtas panaudoti paciento-žmogaus, kuris turi su RG1 ekspresija susijusią ligą, gydymui.

37. Ribozimas terapiškai efektyviame kiekyje, kuris specifiskai skaldo polipeptidą koduojančią RNR, skirtas panaudoti paciento-žmogaus, kuris turi su netinkama RG1 ekspresija susijusią ligą ir kuriam reikia sumažinti polipeptido, turinčio savyje narį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

(a) polipeptido arba jo biologiskai arba imunologiskai aktyvaus fragmento, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką; ir

(b) polipeptido, kuris yra mažiausiai 70 % identiškasis (a) polipeptidui, kiekius, gydymui.

38. Polinukleotidas terapiškai efektyviame kiekyje, kuris yra komplementarus polipeptidą arba jo dalį koduojančiam polinukleotidui, skirtas panaudoti paciento-žmogaus, kuris turi su netinkama RG1 ekspresija susijusią ligą ir kuriam reikia sumažinti polipeptido, turinčio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką, kiekius, gydymui.

39. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 24 punktą, skirtas panaudoti diagnostikoje, analizuojant iš šeimininko paimtą mėginį, nustatant ar jame yra polipeptido, turinčio savyje narį, pasirinktą iš grupės, susidedančios iš:

(a) polipeptido arba jo biologiskai arba imunologiskai aktyvaus fragmento, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką;

(b) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 21-331 aminorūgštis;

(c) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 27-331 aminorūgštis;

(d) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 28-46 aminorūgštis;

(e) polipeptido, apimančio fig. 2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 77-91 aminorūgštis;

(f) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 188-210 aminorūgštis;

(g) polipeptido, apimančio fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytos sekos 263-274 aminorūgštis; ir

(h) polipeptido, kuris yra mažiausiai 70 % identiškasis (a), (b), (c), (d), (e), (f) arba (g) polipeptidui.

40. Panaudojimas pagal 39 punktą, besiskiriantis tuo, kad analizavimas apima mėginio sąlytį su antikūnu arba antikūno fragmentu pagal 24 punktą, kuris specifiskai rišasi su polipeptidu, ir antikūno ryšio su mėginyje esančiu polipeptidu nustatymą.

41. Polinukleotidas, turintis polinukleotido, kuris yra 70 % identiškasis nariui, pasirinktam iš grupės, susidedančios iš:

(a) polinukleotido, koduojančio polipeptidą arba jo biologiškai arba imunologiškai aktyvų fragmentą, apimantį fig.2 (SEQ ID NO: 2) parodytą aminorūgščių seką; ir

(b) polinukleotido, kuris yra komplementarus (a) polinukleotidui, skirtas panaudoti diagnostikoje kaip ieškomas diagnostikos rodiklis, analizuojant mėginį.

42. Antikūnas arba antikūno fragmentas pagal 24 punktą, skirtas panaudoti subjekto metastazių, susijusių su fig.2 (SEQ ID NO: 2) polipeptidu, diagnostikoje, apimantis iš šeimininko paimto mėginio analizavimą, susidedantį iš

(a) subjekto audinio ir/arba skysčio mėginio gavimo;

(b) šio mėginio sąlyčio su antikūnu pagal 24 punktą, ir

(d) šio antikūno ryšio su mėginio polipeptidu nustatymo stadijų.

43. Panaudojimas pagal 42 punktą, besiskiriantis tuo, kad antikūnas yra žymėtas junginiu taip, kad duotų tiesiogiai arba netiesiogiai nustatomą signalą, junginį pasirenkant iš grupės, susidedančios iš radiožymę turinčio junginio, fermento, chromoforo arba fluoroforo.

1 AGAAAGGGT GCGGCAGCAC TGCCAGGGGA AGAGGGTGAT CCGACCCGGG
 51 GAAGGTCGCT GGGCAGGGCG AGTTGGGAAA GCGGCAGCCC CCGCCGCCCC
 101 CGCAGCCCTT TCTCCTCCTT TCTCCACGT CCTATCTGCC TCTCGCTGGA
 151 GGGCAGGGCG TGCAGCATCG AAGACAGGAG GAACTGGAGC CTCATTGGCC
 201 GGGCCGGGGC GCGGGCCTCG GGCTTAAATA GGAGCTCCGG GCTCTGGCTG
 251 GGACCCGACC GCTGCCGGCC GCGCTCCCGC TGCTCCTGCC GGGTGATGGA
 301 AAACCCAGC CCGGCCGCGG CCCTGGGCAA GGCCCTCTGC GCTCTCTCC
 351 TGGCCACTCT CCGCGCCGCC GGCAGCCTC TTGGGGGAGA GTCCATCTGT
 401 TCCGCCGGAG CCCCAGCAA ATACAGCATC ACCTCACGG GCAAGTGGAG
 451 CCAGACGGCC TTCCCAAGC AGTACCCCT GTCCGCCCC CCTGCCAGT
 501 GGTCTTCGCT GCTGGGGGCC GGCATAGCT CCGACTACAG CATGTGGAG
 551 AAGAACCAGT ACGTCAGTAA CCGGCTGCC CACTTTGGG ACGCGGGGA
 601 GGCCTGGGGC CTGATGAAGG AGATCGAGGC GCGGGGGAG GCGCTGCAGA
 651 GCGTGCACGC GGTGTTTTCG GCGCCGCGG TCCCAGCGG CACCGGGCAG
 701 ACGTCGGCGG AGCTGGAGGT GCAGCGCAGG CACTCGCTGG TCTCGTTTGT
 751 GGTCCGCATC GTGCCAGCC CCGACTGGT CGTGGGGGTG GACAGCCTGG
 801 ACCTGTGCGA CGGGGACCGT TGGCGGGAAC AGGCGGGCCT GGACCTGTAC
 851 CCTACGACG CCGGGACGGA CAGCGGCTC ACCTCTCCT CCCCAACTT
 901 CGCCACCATC CCGCAGGACA CCGTGACCGA GATAACGTCC TCCTCTCCA
 951 GCCACCCGGC CAACTCCTTC TACTACCCAC GGCTGAAGGC CCTGCCTCCC
 1001 ATCGCCAGGG TGACACTGGT GCGGCTGCGA CAGAGCCCCA GGGCCTTCAT
 1051 CCCTCCCCC CCAGTCTTC CCAGCAGGA CAATGAGATT GTAGACAGG
 1101 CCTCAGTTCC AGAAACGCCG CTGGACTGG AGGTCTCCCT GTGGTCTGCC
 1151 TGGGACTGT GCGGAGCCA CTGTGGGAGG CTCGGGACCA AGAGCAGGAC
 1201 TCGCTACGTC CGGGTCCAGC CCGCCAACA CCGGAGCCCC TGCCCGAGC
 1251 TCGAAGAAGA GGCTGAGTGC GTCCCTGATA ACTGGTCTA AGACCAGAGC
 1301 CCCGCAGCCC CTGGGGCCCC CCGGAGCCAT GGGGTGTCCG GGGCTCCTGT
 1351 GCAGGCTCAT GCTGCAGCGG GCGGAGGCA CAGGGGGTTT CCGGCTCCTC
 1401 CTGACCGCGG TGAGGCCGGG CCGACCATCT CTGCACTGAA GGGCCCTCTG
 1451 GTGGCCGGCA CCGGCATTGG GAAACAGCCT CCTCCTTCC CAACCTTGCT
 1501 TCTTAGGGG CCCCCTGTCC CGTCTGTCT CAGCCTCGTC CTCCTGCAGG
 1551 ATAAAGTCAT CCCCAGGCT CCAGTACTC TAAATTATGT CTCCTATAA
 1601 GTTATTGCTG CTCCAGGAGA TTGTCTTCA TCGTCCAGGG GCCTGGCTCC
 1651 CACGTGGTGG CAGATACCTC AGACCTGGTG CTCTAGGCTG TCTGAGCCC
 1701 ACTCTCCCGA GGGCGCATCC AAGCGGGGG CACTTGAGAA GTGAATAAAT
 1751 GGGGCGGTTT CGGAAGCGTC AAAAAAAAAA AAAAA

Fig.1

1 MENPSPAAL GKALCALLA TLGAAGQPLG GESICSAGAP AKYSITETGK
 51 WSOTAEPKOY PLERPPAOWS SLIGAAHSSD YSMWRKNOYV SNGLRDEAER
 101 GEAWALMKEI EAAGEALQSV HAVFSAPAVP SGTGQ TSAEL EVORRHSLYS
 151 FVVRIVPSPD WFGVDSL DL CDGDRWROA ALDLYPYDAG TDSGFTESSP
 201 NEATIPOD TV TEITSSSPESH PANSFYYPRL KALPPIARVT LVRLRQSPRA
 251 FIPPAPVLPS RDNEIVDSAS VPETPLDCEY SLWSSWGLCG GHCGRLGTKS
 301 RTRYVRVOPA NNGSPCPELE EEAECVPDNC V

Fig.2

```

RG1      1 MENPSPAAALGKALCALLLTLGA.AGOPLGGESICSAGAPAKYSITFTG 49
      ||| | .| : | ||| ||. |||||:|. | |:|||||
mindin 1 MENVS..FSLDRTLWVFLAMLGSTAGQPLGGESVCTARPLARYSITFTG 48
      |||||:|||||
50 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAAHSSDYSMWRKNQYVSNGLRDFAE 99
      |||||:|||||
49 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAAHSSDYSMWRKNEYVSNGLRDFAE 98
      |||||:|||||
100 RGEAWALMKEIEAAGEALQSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVQRRHSLV 149
      |||||:|||||
99 RGEAWALMKEIEAAGEKLSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVHPRHSLV 148
      |||||:|||||
150 SFVVRIVPSPDWFVGVDSLDCGDRWREQAALDLYPYDAGTDSGFTFSS 199
      |||||:|||||:| ||:| | ||||:|||||
149 SFVVRIVPSPDWFVGVGIDSLDCGGRWKEQVVDLYPHDAGTDSGFTFSS 198
      |||||:|||||
200 PNFATIPQDTVTEITSSSPSHPANSFYYPRLKALPPIARVTLVRLRQSPR 249
      |||||:| | |||||
199 PNFATIPQDTVTEITASSPSHPANSFYYPRLKSLPPIAKVTFVRLRQSPR 248
      |||||:| | |||||
250 AFIPPAPVLP SRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGHCGR LGTK 299
      || ||. | || ||||| |||||:| | |
249 AFAPPSLDLASRGNEIVDSLSPETPLDCEVSLWSSWGLCGGPCGKLGAK 298
      |||||:| | |||||
300 SRTRYVRVQAPANNGSPCPELEEEAECVPDNCV 331
      |||||:| | |||||
299 SRTRYVRVQAPANNGTPCPELEEEAECAPDNCV 330

```

Fig.3


```

721 GCAGCGCAGGCACTCGCTGGTCTCGTTTTGTGGTGGCTATCCTGCCCGGCCCGGACTTJSTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGTCGGCTCCGTGAGCGACCAGAGCAACACCACGCGTAGCACGGGTGCGGGCTGACCAA 780
b   Q R R H S L V S F V V R I V P S P D W F -

781 CGTGGCGGTGGACAGCCTGGACCTGTGCCACGGGGACCGTTGGCGGGAACAGGGCGGGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCACCCGCACCTGTCCGACCTGGACACGCTGCCCTGGCAACCGCCCTTGTCCGCCGCGA 840
b   V G V D S L D L C D G D R W R E Q A A L -

841 GGACCTGTACCCCTACGACGCGGGGACGGACAGCGGCTTACCTTCTCCTCCCCAACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTGGACATGGGGATGCTCGGGCCCTGCCTGTCCCGAAGTGAAGAGGAGGGGGTTGAA 900
b   D L Y P Y D A G T D S G F T F S S P N F -

901 CGCCACCATCCCGCAGGACACGGTGACCGAGATAACGTCCCTCCTCCTCCAGCCACCCGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCGGTGGTAGGGCGTCTGTGCCACTGGCTCTATTGCAGGAGGAGAGGGTTCGGTGGGCGG 960
b   A T I P Q D T V T E I T S S S P S H P A -

961 CAACTCCTTCTACTACCCACGGCTGAAGGCCCTGCCTCCCATCGCCAGGGTGACACTGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTGAGGAAGATGATGGGTGCCGACTTCCGGGACGGAGGGTAGCGGTCCCACTGTGACCA 1020
b   N S F Y Y P R L K A L P P I A R V T L V -

1021 GCGGCTGCGACAGAGCCCCAGGGCCTTCATCCCTCCCGCCCCAGTCTGCCACAGGGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCCGACGCTGTCTCGGGTCCCGGAAGTAGGGAGGGCGGGGTGAGGACGGGTGCTCCCT 1080
b   R L R Q S P R A F I P P A P V L P S R D -

1081 CAATGAGATTGTAGACAGCGCCTCAGTTCCAGAAACGCCGCTGGACTGCGAGGTCTCCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTACTCTAACATCTGTCCGGAGTCAAGGTCTTTGCGGGACCTGACGCTCCAGAGGGA 1140
b   N E I V D S A S V P E T P L D C E V S L -

1141 GTGGTGGTCCCTGGGGACTGTGCGGAGGCCACTGTGGGAGGCTCGGGACCAAGAGCAGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCAGCAGGACCCCTGACACGCCTCCGGTGACACCCTCCGAGCCCTGGTTCTCGTCTCTG 1200
b   W S S W G L C G G H C G R L G T K S R T -

1201 TCGCTACGTCCGGGTCCAGCCCGCAACCAACGGGAGCCCTGCCCGAGCTCGAAGAAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCGATGCAGGCCCAGGTCCGGCGGTTGTTGCCCTCGGGGACGGGGCTCGAGCTTCTTCT 1260
b   R Y V R V Q P A N N G S P C P E L E E E -

1261 GGCTGAGTGGCTCCCTGATAACTGCGTCTAAGACCAGAGCCCCGCAGCCCTGGGGCCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCGACTCACGCAGGGACTATTGACGCAGATTCTGGTCTCGGGGCGTCCGGGACCCCGGGG 1320
b   A E C V P D N C V *

1321 CCGGAGCCATGGGGTGTCCGGGGCTCCTGTGCAGGCTCATGCTGCAGGCGGGCCGAGGGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTCGGTACCCACAGCCCCCGAGGACACGTCCGAGTACGACCTCCGCCGGCTCCCGT 1380
b   CAGGGGGTTTCCCGCTGCTCCTGACCCGGGTGAGGCCCGCGCCGACCATCTCTGCACTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCCCCCAAAGCGCGACACGACTGGCGCCACTCCGGCGCGGCTGGTAGAGACGTCACTT 1440
b   GGGCCCTCTGGTGGCCCGCACGGCCATTGGGAAACAGCCCTCCTCCTTCCCAACCTTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGGGAGACCACCGCCCTGCCCGTAACCCCTTGTCCGAGGAGGAAAGGGTTGGAACGA 1500

```

Fig.4 - tēsinyš

```

1501 TCTTAGGGGCCCCCGTGTCCCGTCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCCTGCAGGATAAAGTCAT 1560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1561 AGAATCCCCGGGGGCACAGGGCAGACGAGAGTCCGAGGAGGAGGACGTCCTATTTTCAGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1562 CCCCCAAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGTCTCCTTATAAGTTATTGCTGCTCCAGGAGA 1620
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1621 GGGGTTCCGAGGTCGATGAGATTTAATACAGAGGAATATCAATAACGACGAGGTCCTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1622 TTGTCTTCATCGTCCAGGGCCTGGCTCCCACGTGGTTGCAGATACCTCAGACCTGGTG 1680
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1681 AACAGGAAGTAGCAGGTCCCCGGACCGAGGGTGCACCAACGTCTATGGAGTCTGGACCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1682 CTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACTCTCCCCGAGGGCGCATCCAAGCGGGGGCCACTTGAGAA 1740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1741 GAGATCCGACACGACTCGGGTGAGAGGGCTCCCGGTAGGTCGCCCCCGGTGAACTCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1742 GTGAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTC 1770
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1771 CACTTATTTACCCCGCCAAAGCCTTCGCAG

```

Fig.4 - tēsinyš

(lapas 3 iš 3)

Rg1 mRNR ekspresija žmogaus audiniuose

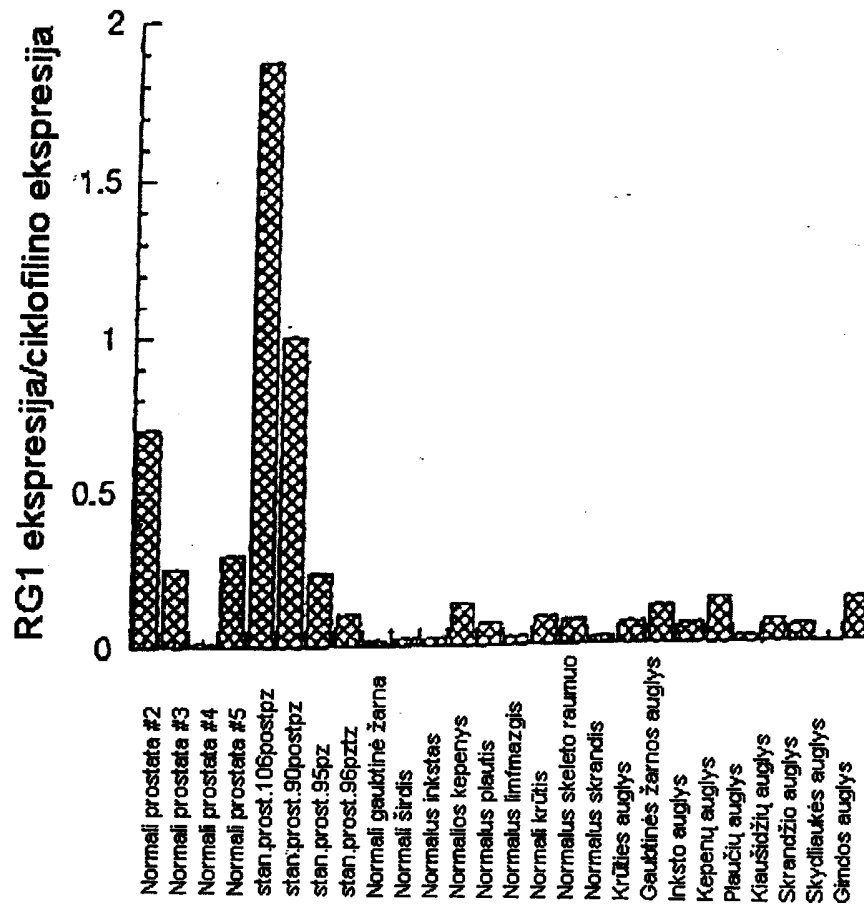


Fig.5

Natūvaus LNCaP ląstelių išskirto RG1 baltymo gryninimas

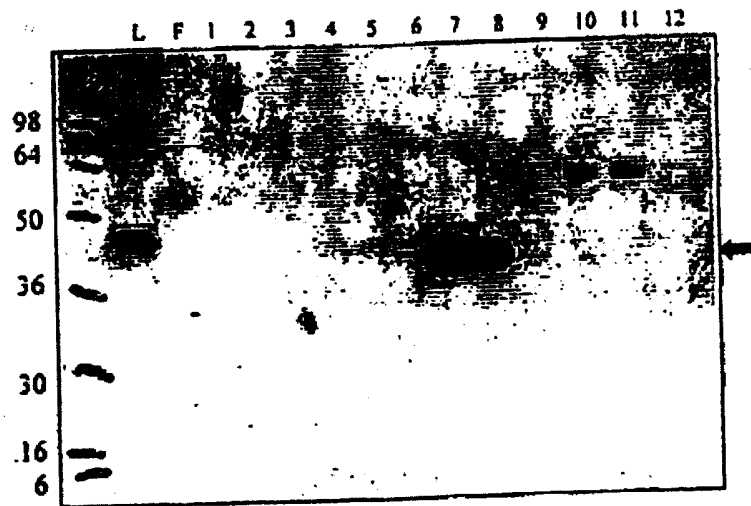


Fig.6

RG1 ekspresijos imunohistocheminis dažymas

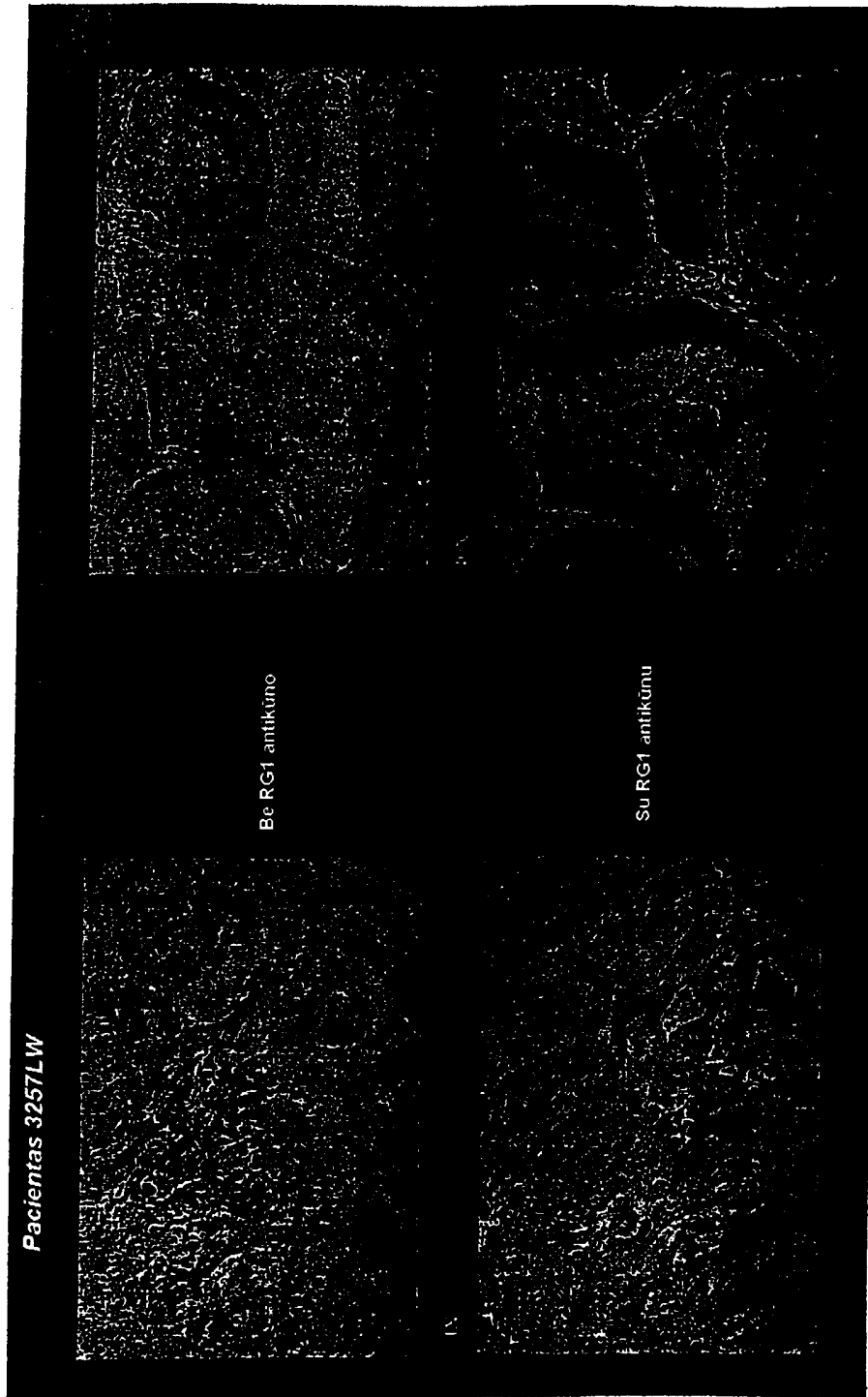


Fig.7