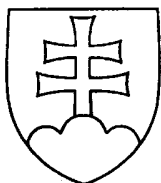


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288147

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2013.01):

C07K 16/00
A61K 39/00
A61K 47/00
A61P 35/00
A61P 13/00

- (21) Číslo prihlášky: **5055-2008**
(22) Dátum podania prihlášky: **15. 12. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/172 370 09/732 357**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **16. 12. 1999 7. 12. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 2. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **02/2003**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **13. 11. 2013**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky: **848-2002**
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/33901**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/44291**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **Schering Aktiengesellschaft, Berlin, DE;**

(72) Pôvodca: **Harkins Richard, Alameda, CA, US;**
Parkes Deborah, Hayward, CA, US;
Parry Gordon, Walnut Creek, CA, US;
Schneider Douglas W., Lafayette, CA, US;
Steinbrecher Renate, Walnut Creek, CA, US;

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Izolovaná protilátka alebo fragment protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, a imunokonjugát**

(57) Anotácia:
Vynález sa týka izolovanej protilátky alebo fragmentu protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, na použitie ako liečivo. Protilátkou je polyklonálna alebo monoklonálna protilátka. Fragment protilátky je zvolený zo skupiny pozostávajúcej z Fv, F(ab') a F(ab')₂ fragmentov. Vynález sa ďalej týka imunokonjugátu obsahujúceho izolovanú protilátku alebo fragment protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, ktoré sú spojené s terapeutickým činidlom, na použitie ako liečivo. Terapeutickým činidlom je cytotoxické činidlo, ako je ricín, doxorubicín, daunorubicín, taxol, etídiumbromid, mitomycín, etoposid, tenoposid, vinkristín, vinblastín, kolchicín, dihydroxyantracindión, aktinomycín D, difterický toxín, *Pseudomonas* exotoxín (PE) A, PE40, abrin, glukokortikoid a rádioizotopy.

SK 288147 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia protilátok zacielených na nedávno identifikované polypeptidy ľudského extracelulárneho matrixu (označované RG1), ich varianty a deriváty.

Doterajší stav techniky

Rakovina prostaty je často sa vyskytujúce ochorenie u mužov, ktorým je postihnutá asi tretina mužov do 45 rokov. Dokázalo sa, že jej vznik súvisí tak s genetickými vplyvmi, ako aj s vplyvmi prostredia, pričom väčšina prípadov je výsledkom kombinácie oboch týchto faktorov. Štúdie rodinného výskytu tejto choroby naznačili, že genetická predispozícia má úlohu asi pri 5 - 10 % všetkých prípadov rakoviny prostaty a pri okolo 45 % prípadov u mužov mladších ako 55 rokov.

Dokázalo sa, že k vzniku rakoviny prostaty dochádza vo viacerých krokoch, pričom jednou z prekursorových lézií je prostatická intraepitelová neoplázia (PIN). Skoré štádiá choroby sú závislé od androgénu, zatiaľ čo neskoršie fázy sú od tohto hormónu nezávislé. Často je klinicky zistená proliferatívna porucha prostaty známa ako benígna prostatická hyperplázia, ale zrejme nie je jedným z vývojových štádií rakoviny. S výskytom rakoviny prostaty je však často spojená. Pri rakovine prostaty je častý výskyt viacerých ložísk, obvyklý je pomalý rast a heterogenita nádorov. V neskorších štádiách dochádza k častému výskytu metastáz v lymfatických uzlinách a v kostiach.

Rakovina prostaty sa obvykle diagnostikuje pri bežnom fyzikálnom vyšetrení a ďalej na základe zvýšenej hladiny prostatického špecifického antigénu (PSA) v sére. Pri lokalizovanej chorobe je optimálnou liečbou radikálna prostatektómia. Pokročilá metastatická choroba sa obvykle lieči potlačením výskytu androgénu orchektómiou alebo liečbou pomocou GnRH (hormón uvoľňujúci gonadotropín), alebo antiandrogénnou liečbou. V pokročilých štádiách sa však choroba stáva rezistentnou na tento hormón a rozvinutá choroba nie je liečiteľná. Navyše tak radikálna prostatektómia, ako liečba potlačením výskytu androgénu má závažné vedľajšie účinky. Medzi ne patrí vysoké riziko inkontinencie a impotencie spojené s radikálnou prostatektómiou a lámavosť kostí a osteoporóza spojená s androgénovou ablačnou liečbou.

Je preto potrebné nájsť nové terapeutické spôsoby na liečbu včasných aj neskorých štádií rakoviny prostaty.

Pri rakovine prostaty boli zaznamenané zmeny v expresii špecifických proteínov, vrátane expresie p53 v neskorších štádiách tejto choroby, znížené hladiny receptorov pre TGF- β , znížené hladiny E-cadherinu, C-Cam (bunková adhezívna molekula) a niekoľkých rôznych integrínov. Expresia onkogénu bcl-2 je pri neskorých nádoroch závislých od androgénu výrazne zvýšená a prognóza pacientov so zvýšenou expresiou bcl-2 je pomerne nepriaznivá. Zatiaľ čo uvedené zmeny génovej expresie boli dobre doložené, dokázalo sa žiadne príčinné spojenie týchto zmien s danou chorobou. Bolo by teda užitočné identifikovať nové proteíny, ktorých expresia je spojená s výskytom či vývojom prostatických nádorov, a ktoré by mohli slúžiť ako molekulárne ciele na diagnostiku a liečbu rakoviny prostaty.

Predkladaný vynález opisuje nový homológ vyššej rodiny proteínov extracelulárneho matrixu. Tento homológ, nazývaný RG1, je exprimovaný v prostatickom tkanive a jeho expresia môže byť v prostatických nádoroch zvýšená.

Extracelulárny matrix je komplexný sieťovitý útvar, tvorený kolagénom a elastínom, uložený vo viskózne-elastickej základnej hmote z proteoglykánov a glykoproteínov. Matrix tvorí trojrozmernú podpornú konštrukciu, ktorá oddeľuje jednotlivé bunkové kompartmenty, sprostredkováva bunkové väzby a určuje štruktúru tkaniva (Bissel et al., J. Theor. Biol. 99: 31 - 68, 1982; Carlson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2403 - 2406, 1981). Matrix funguje ako makromolekulárny filter (Hay, E.D., Cell Biology of Extracellular Matrix, New York, Plenum Press, 1982) a má tiež vplyv na bunkovú diferenciáciu, mitogénézu a morfogénézu (Gospodarowicz, D., Cancer Res. 38: 4155 - 171, 1978). Biochemické interakcie medzi normálnymi bunkami a matrixom môžu byť pri neoplázii pozmenené a môžu tak ovplyvňovať nádorový rast. Nádorové bunky môžu s matrixom interagovať rôznym spôsobom. Bud' sa môžu prichytiť na matrix prostredníctvom špecifických plazmatických membránových receptorov (Terranova et al., Cancer Res. 42: 2265 - 2269, 1982). Alebo môže byť matrix degradovaný kaskádou enzýmov dodávaných nádorovými aj hostiteľskými bunkami (Eisen et al., Biochem. Biophys. Acta 151: 637 - 645, 1968). A nakoniec môžu nádorové bunky v diferencovaných častiach nádoru syntetizovať a hromadiť matrix alebo vyvolávať hromadenie nadbytočného matrixu v hostiteľských bunkách (Brownstein et al., Cancer 40: 2979 - 2986, 1977).

RG1 má homológiu s vyššou rodinou proteínov extracelulárneho matrixu, ktoré sú kódované génmi Mindin/F-spondin. Táto génová rodina má spoločné dve konzervatívne spodinové domény FS1 a FS2 blízko N-konca a najmenej jeden opakujúci sa úsek trombospondínu typu 1 (TSR1) na C-konci (Shimeld, S.M., Mol. Biol. Evol. 15(9): 1218 - 1223, 1998). Motív TSR sa pôvodne našiel v proteínoch extracelulárneho matrixu stavovcov (Bornstein, P., J. Cell. Biol. 130: 503 - 506, 1995) a potom sa našiel aj v niekoľkých ďalších prote-

ínach extracelulárneho matrixu. Existuje rad dôkazov, že oblasti TSR sprostredkujú bunkovú adhéziu a majú kľúčovú úlohu pri vzniku nádorov. Bolo napr. dokázané, že proteolytické fragmenty trombospondínu obsahujúce oblasť TSR a syntetické peptidy so sekvenciami, ktoré zodpovedajú TSR oblasti trombospondínu podporujú adhéziu nádorových buniek a vytváranie metastáz (Prater et al., J. Cell Biol. 112: 1031 - 1040, 1991; Tuszyński and Nicosia, BioEssays 18: 71 - 76, 1996), vykazujú antiangiogénnu aktivitu (Tolsma et al., J. Cell Biol. 122: 497 - 511, 1993) a inhibujú zhlukovanie krvných doštičiek a metastázovanie melanómov (Tuszyński et al., J. Cell Biol. 116: 209 - 217, 1992).

V súčasnej dobe patrí do tejto vyššej rodiny génov jeden gén *Caenorhabditis elegans*, jeden gén *Drosophila* a niekoľko génov stavovcov. V *C. elegans* gén F10E7.4 kóduje okrem FS1 a FS2 päť oblastí TSR (Higashijima et al., Dev. Biol. 192: 211 - 227, 1997). Člen tejto rodiny u *Drosophila* nazývaný M-spondin (mspo) obsahuje domény FS1 a FS2 a jedinu oblasť TSR (Umeyama et al., Dev. Biol. 186: 165 - 176, 1997). Gén pre M-spondin kóduje sekretovaný proteín, ktorý sa nachádza v miestach svalových úponov a slúži ako proteín extracelulárneho matrixu, ktorý podporuje pripojenie svalov k apodému. Členovia tejto rodiny génov u stavovcov zahŕňajú gény izolované z *Danio rerio* (zebrafish) (Mindin1 a Mindin2, F-spondin1 a F-spondin2), potkaní F-spondin, F-spondin žiab *Xenopus* a potkaní Mindin. Mindin1 a Mindin2 sú navzájom blízko príbuzné a ich génová štruktúra je podobná M-spondínu *Drosophila*. Oba tieto gény kódujú okrem domén FS1 a FS2 jedinu oblasť TSR (Higashijima et al., Dev. Biol. 192: 211 - 227, 1997). Gény pre F-spondin1 a F-spondin2 *Danio rerio* (zebrafish), potkaní F-spondin (Klár et al., Cell 69: 95 - 110, 1992) a F-spondin žiab *Xenopus* (Altaba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8268 - 8272) majú všetky podobnú štruktúru a kódujú okrem domén FS1 a FS2 šesť kópií oblasti TSR. U stavovcov je možné vyššiu rodinu génov Mindin/F-spondin rozdeliť do dvoch skupín: gény blízko príbuzné pôvodným potkaním génom pre F-spondin a Mindin a gény blízko príbuzné génu pre M-spondin *Drosophila*. Tak pre Mindin, ako aj gén pre F-spondin u stavovcov kódujú proteíny, ktoré sú primárne exprimované bunkami dna neutrálnej trubice počas embryonálneho vývoja.

Nedávno bol z kopytníka *Amphioxus* izolovaný jediný gén príbuzný F-spondínu, Amphif-spondin (Shimeld, S.M., Mol. Biol. Evol. 15 (9): 1218 - 1223, 1998).

Na základe molekulárnej fylogenetiky je Amphif-spondin blízko príbuzný určitej skupine génov stavovcov pre F-spondin, ktoré kódujú šesť oblastí TSR. Amphif-spondin kóduje tri oblasti TSR a dva opakujúce sa úseky fibronektínu typu III, z ktorých jeden vykazuje silnú podobnosť s opakujúcim sa úsekom fibronektínu typu III produktu génu DCC („Deleted in Colorectal Cancer“). Expresiu tohto proteínu je možné nájsť vo väčšine oblastí centrálného nervového systému a nielen v stredovej línii, ako bolo opísané pri proteínoch Mindin a F-spondin stavovcov.

Tieto fakty naznačujú, že proteíny extracelulárneho matrixu, ako napr. nový proteín RG1, ktorý je homológom vyššej rodiny Mindin/F-spondin, by mohli byť dobrými kandidátmi na využitie na diagnostiku rakoviny a na použitie na liečenie.

WO98/45442 sa týka sekretovaného zsig25 polypeptidu exprimovaného vo veľkej miere v tkanive prostaty a protilátok k zsig25 polypeptidu. Aminokyselinová sekvencia zsig25 polypeptidu zodpovedá v podstate sekvencii RG1 polypeptidu. Ale nebol identifikovaný žiadny epitop zo zsig25 polypeptidu.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je izolovaná protilátka alebo fragment protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, ako je uvedený v SEQ ID NO: 2, pričom protilátka sa špecificky viaže na člen zvolený zo skupiny pozostávajúcej z:

- polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 77 až aminokyselinu 91 uvedenú na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);
 - polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 263 až aminokyselinu 274 uvedenú na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);
- na použitie ako liečivo.

Protilátka na uvedené použitie je polyklonálna alebo monoklonálna protilátka. Fragment protilátky je zvolený zo skupiny pozostávajúcej z Fv, F(ab') a F(ab')₂ fragmentov.

Ďalej je predmetom vynálezu imunokonjugát obsahujúci izolovanú protilátku alebo fragment protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, ako je uvedený v SEQ ID NO: 2, pričom izolovaná protilátka alebo jej fragment sa špecificky viažu na člen zvolený zo skupiny pozostávajúcej z:

- polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 77 až aminokyselinu 91 uvedenú na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);
 - polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 263 až aminokyselinu 274 uvedenú na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);
- spojené s terapeutickým činidlom, na použitie ako liečivo.

Terapeutickým činidlom je cytotoxické činidlo.

Cytotoxické činidlo je zvolené zo skupiny pozostávajúcej z ricínu, doxorubicínu, daunorubicínu, taxolu, etidumbromidu, mitomycínu, etoposidu, tenoposidu, vinkristínu, vinblastínu, kolchicínu, dihydroxyantracín-

diónu, aktinomycínu D, difterického toxínu, *Pseudomonas* exotoxínu (PE) A, PE40, abrinu, glukokortikoidu a rádioizotopov.

Predkladaný vynález opisuje polynukleotidovú sekvenciu, ktorá kóduje výhradne nový proteín, ktorý je označovaný ako RG1. Polypeptid RG1 vykazuje homológiu s potkaním Mindinom, proteínom extracelulárneho matrixu. Obsahuje hydrofóbnú signálnu sekvenciu na N-konci, dve spondínové domény (FS1 a FS2) a opakujúci sa úsek („repeat“) trombospondínu typu I na C-konci. RG1 má 89,7 % podobnosť s potkaním Mindinom. Polynukleotidová sekvencia označovaná ako *rgl* a uvedená na obr. 1 (a v zozname sekvencií ako sekvencia SEQ ID NO: 1) kóduje aminokyselinovú sekvenciu RG1, ktorá je uvedená na obr. 2 (v zozname sekvencií ako sekvencia SEQ ID NO: 2).

Tento vynález poskytuje polypeptidy, ktoré boli identifikované, ako nové proteíny homologické s rodinou proteínov extracelulárneho matrixu, ktorá sa nazýva Mindin, ako ukazuje porovnanie aminokyselinovej sekvencie uvedenej na obr. 2 (sekvenca SEQ ID NO: 2) so známymi aminokyselinovými sekvenciami iných proteínov extracelulárneho matrixu.

Vynález ďalej poskytuje polynukleotidy kódujúce tieto polypeptidy, najmä polynukleotidy kódujúce polypeptidy označované ako RG1.

Poskytujú sa izolované polynukleotidy kódujúce RG1, vrátane mRNA a cDNA a ich biologicky, diagnosticky, klinicky alebo terapeuticky využiteľné varianty, analógy a deriváty, vrátane fragmentov ich variantov analógov a derivátov.

Medzi zvlášť výhodnými uskutočneniami sú prirodzene sa vyskytujúce alelické varianty polynukleotidov, ktoré kódujú varianty polypeptidov označované ako RG1.

Poskytujú sa nové polypeptidy ľudského pôvodu označované ako RG1 ako aj ich biologicky, diagnosticky či terapeuticky využiteľné fragmenty, varianty a deriváty, varianty a deriváty ich fragmentov, vrátane ich analógov.

Medzi zvlášť výhodnými uskutočneniami sú varianty RG1 kódované prirodzene sa vyskytujúcimi alelickými variantmi polynukleotidu *rgl*.

Taktiež sa poskytuje spôsob prípravy už zmienených polypeptidov, ich fragmentov, variantov a derivátov, fragmentov variantov a derivátov a ich analógov. Vo výhodnom uskutočnení sa poskytujú spôsoby prípravy zmienených polypeptidov RG1, zahŕňajúce kultiváciu hostiteľských buniek, do ktorých bol vložený exogénne odvodený polynukleotid kódujúci RG1 exprimovateľný za podmienok na expresiu ľudského RG1 v hostiteľovi, s následnou izoláciou exprimovaného polypeptidu.

Poskytujú sa prípravky, zlúčeniny a spôsoby využívajúce už zmienené polypeptidy a polynukleotidy okrem iného na výskumné, biologické, klinické a terapeutické účely.

Poskytujú sa prípravky, zlúčeniny a spôsoby, ktoré slúžia na vyhodnotenie expresie RG1 v bunkách stanovením polypeptidov RG1 a mRNA kódujúce RG1; a ďalej stanovením genetických variácií a aberácií, napr. defektov, v génoch *rgl*.

V súlade s určitými výhodnými uskutočneniami sa poskytujú sondy, ktoré hybridizujú so sekvenciami *rgl*.

Predmetom tohto vynálezu sú protilátky na použitie ako liečivo, ktoré sú vysoko selektívne pre polypeptidy RG1 alebo fragmenty týchto protilátok, ktoré je možné využiť na diagnostiku a/alebo detekciu expresie RG1, ktorá by mohla byť spojená s rakovinou prostaty. V súlade s určitými výhodnými uskutočneniami tohto zámeru vynálezu sú tieto protilátky značené tak, aby poskytli detegovateľný signál. Zvlášť výhodné sú protilátky značené rádioaktívne, enzymaticky, pomocou chromofóru alebo fluorescenčne.

V ďalšom aspekte tohto vynálezu sú opísané protilátky na použitie ako liečivo, konjugované s terapeutickou látkou určené na podanie do buniek *in vitro*, *ex vivo* alebo *in vivo*, alebo na podanie do mnohobunkového organizmu. V tomto ohľade sú zvlášť výhodné terapeutické látky (terapeutické agens, terapeutické činidlá), ktoré sú cytotoxické. V určitých uskutočneniach výhodných z tohto hľadiska ide o podanie takých konjugovaných protilátok ľudským pacientom na liečbu chorobného stavu, ktorý je charakterizovaný aktivitou alebo expresiou RG1, ako napr. rakovina prostaty.

V ďalšom aspekte tohto vynálezu sú opísané peptidy a antiidiotypové protilátky, ktoré je možné využiť na stimuláciu imunitnej odpovede.

Poskytujú sa ribozýmy a polynukleotidy komplementárne k polynukleotidom *rgl* (t.j. „antisense“ polynukleotidy) určené na podanie do buniek *in vitro*, *ex vivo* alebo *in vivo*, alebo do mnohobunkového organizmu. Zvlášť výhodné z tohto hľadiska je podanie „antisense“ molekúl ľudským pacientom na liečenie chorobného stavu, ako napr. rakoviny prostaty či benígnej prostatickej hyperplázie, ktorý sa zmierni znížením úrovne aktivity RG1.

Ďalšie predmety, vlastnosti, výhody a aspekty predkladaného vynálezu vyplynú pre odborníkov z nasledujúceho opisu. Malo by však byť zrejmé, že nasledujúci opis a špecifické príklady, ktoré ukazujú výhodné uskutočnenia tohto vynálezu, slúžia iba na ilustráciu.

Definície

Tak ako sa používajú v opise vynálezu, príkladoch a pripojených nárokoch, majú nasledujúce termíny stanovený význam, pokiaľ nie je výslovne určené inak.

„RG1“ označuje polypeptid, ktorého aminokyselinová sekvencia je uvedená na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2); jeho varianty, analógy, deriváty a fragmenty a fragmenty týchto variantov, analógov a derivátov. Termíny „fragment“, „derivát“ a „analóg“, pokiaľ sa vzťahujú na polypeptid na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), označujú polypeptid, ktorý má v podstate tú istú biologickú a/alebo imunologickú aktivitu ako polypeptid na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

„Rgl“ označuje polynukleotid, ktorého sekvencia je uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1) a polynukleotidy, ktoré kódujú polypeptidy, ktorých aminokyselinová sekvencia je uvedená na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2); a ďalej polynukleotidy, ktoré kódujú varianty, analógy, deriváty a fragmenty RG1 a fragmenty týchto variantov, analógov a derivátov. Rgl tiež označuje tieto polynukleotidy vo forme RNA a polynukleotidy, ktoré sú komplementárne k polynukleotidom, ktoré kódujú polypeptidovú sekvenciu, ktorá je uvedená na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

Termín „polynukleotid“ obvykle označuje akýkoľvek polyribonukleotid či polydeoxyribonukleotid, ktorým môže byť nemodifikovaná RNA či DNA alebo modifikovaná RNA či DNA. Tak napr. polynukleotidy, ako sú uvedené, označujú okrem iného jednovláknovú a dvojitú vláknovú DNA, DNA, ktorá je zmesou jedno- a dvojitú vláknových oblastí, jedno- a dvojitú vláknovú RNA a RNA, ktorá je zmesou jedno- a dvojitú vláknových oblastí, hybridné molekuly obsahujúce DNA a RNA, ktoré môžu byť jednovláknové alebo, čo je typickejšie, dvojitú vláknové alebo zmes jedno- a dvojitú vláknových oblastí. Navyše, termín polynukleotid, ako je použitý označuje aj oblasti trojitú vláknovej RNA či DNA alebo trojitú vláknovej oblasti obsahujúcej tak RNA, ako aj DNA. Vlákna týchto oblastí môžu pochádzať tak z tej istej molekuly, ako z rôznych molekúl. Tieto oblasti môžu zahŕňať úseky pochádzajúce zo všetkých týchto molekúl, ale v typickejšom prípade sú mienené úseky iba niektorých týchto molekúl. Jednou z molekúl takejto trojitú vláknovej oblasti často býva oligonukleotid.

Termín „polynukleotid“, ako sa tu používa, označuje tiež molekuly DNA alebo RNA, ako sú tu opísané, a ktoré obsahujú jednu alebo viac modifikovaných báz. To znamená, že molekuly DNA či RNA, ktorých cukor-fosfátová kostra bola pozmenená na zvýšenie stability alebo z iných dôvodov, sú tu tiež označované termínom „polynukleotidy“. Navyše, molekuly DNA či RNA, ktoré obsahujú neobvyklé bázy ako napr. inozín či modifikované bázy ako bázy značené trícium, aby sa uviedli aspoň dva príklady, sa tiež označujú používaným termínom polynukleotidy.

Je zrejme, že na molekulách DNA a RNA sa uskutočnilo množstvo rôznych modifikácií, ktoré slúžia na rôzne užitočné účely známe odborníkom v odbore. Termín „polynukleotid“, ako je používaný, zahŕňa okrem iného takéto chemicky, enzymaticky či metabolicky modifikované formy polynukleotidov, ako aj chemické formy DNA či RNA charakteristické pre vírusy či bunky, a to pre bunky jednoduché aj zložité, *inter alia*.

Termín „polypeptidy“, ako je tu používaný, zahŕňa všetky polypeptidy, ktoré sú opísané. Základná štruktúra polypeptidov je dobre známa a je opísaná v nespočetnom množstve učebníc a iných odborných publikácií. V kontexte predkladaného vynálezu označuje tento termín akýkoľvek peptid alebo proteín obsahujúci dve alebo viac aminokyselín, ktoré sú vzájomne spojené do lineárneho reťazca peptidovou väzbou. Tento termín, ako sa tu používa, označuje tak krátke reťazce, ktoré sú tiež bežne v stave techniky označované napr. ako peptidy, oligopeptidy a oligoméry, ako aj dlhé reťazce, ktoré sa v stave techniky bežne označujú ako proteíny, ktorých je mnoho typov.

Je zrejme, že polypeptidy často obsahujú aminokyseliny iné ako 20 aminokyselín obvykle označovaných ako 20 prirodzené sa vyskytujúci aminokyseliny a že mnoho aminokyselín, vrátane koncových, môže byť v danom polypeptide modifikovaných a to buď prirodzenou cestou ako glykozyláciou, alebo inými posttranslačnými modifikáciami alebo chemickými modifikačnými spôsobmi odborníkom dobre známym. Dokonca aj bežné modifikácie, ktoré sa v polypeptidoch prirodzene vyskytujú, sú príliš početné, aby ich bolo možné vyčerpávajúci spôsobom vymenovať, ale sú dobre opísané v základných príručkách a detailnejších monografiách, ako aj v rozsiahlej odbornej literatúre a sú dobre známe odborníkom. Medzi známe modifikácie, ktoré sa môžu vyskytovať v polypeptidoch zmienených v predkladanom vynáleze, patria, aby sa vymenovalo aspoň niekoľko ilustratívnych príkladov, acetylácia, acylácia, ADP-ribozylácia, amidácia, kovalentné naviazanie flavínu, kovalentné naviazanie hému, kovalentné naviazanie polynukleotidu alebo derivátu polynukleotidu, kovalentné naviazanie lipidu alebo derivátu lipidu, kovalentné naviazanie fosfatidylinozitolu, tvorba priečných väzieb, cyklizácia, tvorba disulfidových mostíkov, demetylácia, tvorba priečných kovalentných väzieb, tvorba cystínu, tvorba pyroglutamátu, formylácia, gama-karboxylácia, glykácia, glykozylácia, tvorba kotvy GPI, hydroxylácia, jodácia, metylácia, myristylácia, oxidácia, proteolitické úpravy, fosforylácia, prenylácia, racemizácia, naviazanie selénu, naviazanie síry, adícia aminokyseliny prostredníctvom transferovej RNA ako napr. arginylácia a naviazanie ubikvitínu.

Tieto modifikácie sú odborníkom dobre známe a boli detailne opísané v odbornej literatúre. Rad zvlášť známych modifikácií, ako napr. glykozylácia, naviazanie lipidov, naviazanie síry, gama-dekarboxylácia, naviazanie zvyškov glutámovej kyseliny, hydroxylácia a ADP-ribozylácia, boli opísané v celkom základných

príručkách, ako napr. I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1993. Na túto tému existuje mnoho prehľadných článkov, ako napr. texty, ktoré publikovali 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, a Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48 - 62, 1992.

Je zrejmé, ako je všeobecne známe a tu už poukázané, že polypeptidy nie sú vždy lineárne. Napr. polypeptidy môžu byť rozvetvené dôsledkom naviazania ubiquitínu, môžu byť cirkulárne, s rozvetvením alebo bez neho, obvykle ako dôsledok posttranslačných úprav, vrátane prirodzených úprav alebo procesov spôsobených ľudskou manipuláciou, ku ktorým normálne nedochádza. Cirkulárne, vetvené a cirkulárne vetvené polypeptidy môžu byť syntetizované netranslačnými prirodzenými procesmi aj čisto syntetickými spôsobmi.

Modifikácie sa môžu vyskytovať kdekoľvek v polypeptide, vrátane peptidovej kostry, bočných reťazcov aminokyselín alebo N- a C-konca. V skutočnosti je blokovanie aminoskupiny alebo karboxyskupiny, alebo oboch týchto skupín prostredníctvom kovalentnej modifikácie bežne sa vyskytujúcim javom v prirodzene sa vyskytujúcich aj syntetických polypeptidoch a tieto modifikácie sa môžu v polypeptidoch uvedených v predkladanom vynáleze vyskytovať tiež. Napr. N-koncovým aminokyselinovým zvyškom polypeptidov produkovaných *E. coli* pred proteolytickou úpravou bude vždy N-formylmetionín.

Modifikácie vyskytujúce sa v polypeptide sú často výsledkom spôsobu, akým tento polypeptid vznikol. Pri polypeptidoch, ktoré vznikli napr. expresiou génu klonovaného v hostiteľovi, bude podstata a rozsah modifikácií z veľkej časti určený posttranslačnou modifikačnou kapacitou hostiteľskej bunky a modifikačnými signálmi, ktoré sa nachádzajú v aminokyselinovej sekvencii polypeptidu. Napr. ako je dobre známe, glykozylácia sa často nevyskytuje pri bakteriálnych hostiteľoch ako *E. coli*. Pokiaľ sa teda glykozylácia požaduje, polypeptid by mal byť exprimovaný v glykozylujúcom hostiteľovi, obvykle v eukaryotickej bunke. Bunky hmyzu často uskutočňujú tie isté posttranslačné glykozylácie ako cicavčie bunky a preto boli napr. vyvinuté hmyzie expresné systémy na účinnú expresiu cicavčích proteínov, ktoré majú natívnu formu glykozylácie. Podobné úvahy sa vzťahujú aj na iné modifikácie.

Je zrejmé, že ten istý typ modifikácie sa môže vyskytovať v tej istej alebo rôznej miere na rôznych miestach daného polypeptidu. Daný polypeptid tiež môže obsahovať mnoho typov modifikácií.

Termín polypeptid, ako sa používa, obvykle zahŕňa všetky takéto modifikácie, najmä tie, ktoré sa nachádzajú v polypeptidoch syntetizovaných expresiou polynukleotidu v hostiteľskej bunke.

Termín „polynukleotid kódujúci polypeptid“, ako sa tu používa, zahŕňa polynukleotidy obsahujúce sekvenciu, ktorá kóduje polypeptid uvedený v predkladanom vynáleze, v konkrétnom prípade polypeptid RG1, ktorého aminokyselinová sekvencia je uvedená na obr. 2 (sekvenca SEQ ID NO: 2). Tento termín zahŕňa polynukleotidy, ktoré obsahujú jednu súvislú oblasť alebo nesúvislé oblasti, ktoré kódujú polypeptid (prerušené napr. intrónmi) spolu s ďalšími oblasťami.

„Biologická aktivita“ označuje štrukturálne, regulačné alebo biochemické funkcie prirodzene sa vyskytujúceho polypeptidu RG1.

„Imunologická aktivita“ označuje schopnosť prirodzeného, rekombinantného alebo syntetického RG1, alebo akéhokoľvek jeho fragmentu vyvolať špecifickú imunitnú odpoveď v zodpovedajúcom živočíchovi či bunke, a viazať špecifické protilátky.

Termín „oligonukleotid“ označuje pomerne krátke polynukleotidy. Tento termín sa často vzťahuje na jednovláknové deoxyribonukleotidy, ale môže tiež označovať okrem iného jedno- či dvojitovláknové ribonukleotidy, hybridy RNA a DNA a dvojitovláknovej DNA. Oligonukleotidy, ako napr. jednovláknové oligonukleotidy sond DNA, sa často syntetizujú chemickými spôsobmi, napr. pomocou automatických syntetizátorov oligonukleotidov. Oligonukleotidy sa však môžu pripraviť aj množstvom iných metód, vrátane metód *in vitro* využívajúcich rekombinantnú DNA a expresiu DNA v bunkách a organizmoch. „Oligonukleotidy“ alebo „oligoméry“ alebo polynukleotidový „fragment“, „úsek“ alebo „segment“ označuje polynukleotidovú sekvenciu s najmenej 10 nukleotidmi a najviac približne 60 nukleotidmi, výhodne asi 15 až 30 nukleotidmi a najvýhodnejšie približne 20 až 25 nukleotidmi.

„Prirodzene sa vyskytujúci RG1“ označuje RG1 produkovaný ľudskými bunkami, ktoré neboli geneticky modifikované a špecificky označuje rôzne formy RG1, ktoré vznikli posttranslačnými úpravami polypeptidu zahŕňajúcimi, ale bez obmedzenia, acetyláciu, karboxyláciu, glykozyláciu, fosforyláciu, lipidáciu, acyláciu a štiepenie.

Termín „variant (y)“ polynukleotidov alebo polypeptidov, ako sa používa v tomto texte, označuje polynukleotidy alebo polypeptidy, ktoré sa líšia od referenčného polynukleotidu či polypeptidu. Varianty v tomto zmysle sú opísané neskôr a na iných miestach v predkladanom vynáleze detailnejšie.

(1) Polynukleotid, ktorý sa líši svojou sekvenciou od iného, referenčného polynukleotidu. Tieto rozdiely sú obvykle obmedzené, takže sekvencie referenčného polynukleotidu a jeho variantov sú veľmi podobné a v mnohých oblastiach sú zhodné.

Ako je poukázané ďalej, zmeny v sekvencii variantu polynukleotidu môžu byť bez vonkajšieho prejavu. To znamená, že nemusia ovplyvniť aminokyselinovú sekvenciu polypeptidu kódovaného polynukleotidom.

Tam, kde sú zmeny obmedzené na tento typ bez vonkajšieho prejavu, variant kóduje polypeptid s veľkosťou tej istej aminokyselinovej sekvencie ako referenčný polypeptid. Ako sa uvádza ďalej, zmeny v sekvencii variantu polynukleotidu môžu spôsobiť zmeny v aminokyselinovej sekvencii polypeptidu kódovaného referenčným polynukleotidom. Takéto zmeny polynukleotidu môžu viesť k substitúcii, adícii, delícii alebo fúzii aminokyselín alebo skracovaniu aminokyselinovej sekvencie kódovanej referenčnou sekvenciou, ako bude opísané ďalej.

(2) Polypeptid, ktorý sa aminokyselinovou sekvenciou líši od iného, referenčného polypeptidu. Tieto zmeny sú obvykle obmedzené, takže sekvencie referenčného polypeptidu a jeho variantu sú veľmi podobné a v mnohých oblastiach sú zhodné. Referenčný polypeptid a jeho variant sa môžu odlišovať v aminokyselinovej sekvencii jednou lebo viacerými substitúciami, adíciami, deléciami, fúziami alebo skrátením sekvencie, pričom tieto zmeny môžu byť prítomné v rôznych kombináciách. Rekombinantné varianty kódujúce tieto alebo podobné polypeptidy môžu byť syntetizované alebo selektované na základe tzv. „redundancie“ genetického kódu. Rôzne substitúcie kodónov, ako napr. tie, ktoré sa navonok neprejavajú, ale vedú k vzniku rôznych restriktčných miest, sa môžu využiť na optimalizáciu klonovania do plazmidu alebo vírusového vektora, alebo expresie v určitom prokaryotickom alebo eukaryotickom systéme. Mutácie sa môžu tiež zavádzať s cieľom modifikovať vlastnosti polypeptidu, meniť jeho väzbovú afinitu na ligandy, afinitu medzi reťazcami, degradáciu alebo rýchlosť obratu polypeptidu (polypeptid turnover rate).

Termín „alelický variant“ označuje alternatívnu formu polynukleotidu *rgl*. Alely sú výsledky mutácie, t. j. zmeny v sekvencii polynukleotidu a obvykle vedú k vzniku pozmenených mRNA alebo polypeptidov, ktorých štruktúra alebo funkcia môže alebo nemusí byť pozmenená. Akýkoľvek gén môže mať žiadnu, jednu alebo viac alelických foriem. Bežné mutačné zmeny vedúce k vzniku alel sú pripisované prirodzeným deléciami, adíciami alebo substitúciám nukleotidov. Každý typ týchto zmien sa môže v danej sekvencii uskutočniť buď samostatne, alebo v kombinácii s ostatnými, jeden alebo viackrát.

„Derivát“ označuje polynukleotid alebo polypeptid odvodený z prirodzene sa vyskytujúceho *rgl* alebo RGI chemickými modifikáciami, ako je naviazanie ubikvitínu, značenie (napr. rádionuklidmi, rôznymi enzymatickými modifikáciami), „pegylácia“ (tvorbou derivátov pomocou polyetylénglykolu, PEG) alebo inzercia alebo substitúcia aminokyselín, ako je ornitín (alebo substitúcia nukleotidov, ktoré kódujú túto aminokyselinu), ktoré sa normálne v ľudských proteínoch nevyskytujú.

„Delécia“ je definovaná ako zmena sekvencie polynukleotidu alebo aminokyselinovej sekvencie, kde chýba jeden alebo viac nukleotidov alebo aminokyselinových zvyškov.

„Inzercia“ alebo „adícia“ je taká zmena sekvencie polynukleotidu alebo aminokyselinovej sekvencie, keď dochádza k prídaniu jedného alebo viac nukleotidov či aminokyselinových zvyškov v porovnaní s prirodzene sa vyskytujúcou sekvenciou polynukleotidu alebo polypeptidu.

„Substitúcia“ je výsledkom nahradenia jedného alebo viac nukleotidov či aminokyselín odlišnými nukleotidmi či aminokyselinami, tak ako je uvedené.

Substitúcie aminokyselín sú výhodne výsledkom nahradenia jednej aminokyseliny inou aminokyselinou vykazujúcou podobné štruktúrne a/alebo chemické vlastnosti, napr. nahradenie leucínu izoleucínom či valínom a asparátu glutamátom alebo treonínu serínom, t. j. konzervatívne nahradenie aminokyseliny. Inzercie alebo delécie prebiehajú v rozmedzí od 1 do 5 aminokyselín. Povolená variácia môže byť experimentálne určená uskutočňovaním systematických inzercií, delécií alebo substitúcií aminokyselín v polypeptide pomocou metód rekombinantnej DNA a testovanie aktivity vzniknutých rekombinantných variantov.

„Fragment“ je polypeptid s aminokyselinovou sekvenciou totožnou s časťou, ale nie s celkom aminokyselinovej sekvencie už spomenutých polypeptidov RGI a ich variantov alebo derivátov.

Polypeptidový „fragment“, „úsek“ alebo „segment“ predstavuje spojené aminokyselinové zvyšky v minimálnom počte 5, často aspoň 7, typicky aspoň 9 až 13 aminokyselín a v rôznych uskutočneniach predkladaného vynálezu aspoň 17 alebo viac aminokyselín.

„Rekombinant“ alebo „rekombinantná molekula DNA“ označuje sekvenciu polynukleotidu, ktorá sa prirodzene nevyskytuje alebo je pripravená umelou kombináciou dvoch inak oddelených segmentov alebo sekvencií. „Rekombinantne pripravený“ znamená pripravený umelou kombináciou oddelených segmentov polynukleotidov, často využitím buď chemických prostriedkov, alebo umelých manipulácií, napr. technikami génového inžinierstva. Tieto manipulácie sa obvykle uskutočňujú preto, aby bol jeden kodón nahradený iným, redundantným kodónom kódujúcim tú istú či konzervatívnu aminokyselinu, pričom je typicky vnesené či odstránené rozpoznávacie miesto sekvencie. Inak sa uskutočňuje spájanie segmentov polynukleotidov s požadovanými funkciami s cieľom vytvoriť jedinu genetickú entitu, ktorá obsahuje požadovanú kombináciu funkcií, a ktorá sa inak v prirodzenej bežnej forme nevyskytuje. Takto môžu byť cielene vložené rozpoznávacie miesta pre restriktčné enzýmy, regulačné sekvencie či iné využiteľné oblasti. „Rekombinantné molekuly DNA“ zahŕňajú klonovacie a expresné vektory. „Rekombinant“ môže tiež označovať polynukleotid, ktorý kóduje polypeptid a je pripravený pomocou technik rekombinantnej DNA.

„Izolovaný“ znamená pozmenený „ľudským zásahom“ zo svojho prirodzeného stavu, t. j. pokiaľ sa vyskytuje v prírode, bol pozmenený či odstránený zo svojho prirodzeného prostredia alebo oboch. Napr. priro-

dzene sa vyskytujúci polynukleotid alebo polypeptid prirodzene sa vyskytujúci v živom zvierati vo svojom prirodzenom stave nie je „izolovaný“, ale ten istý polynukleotid alebo polypeptid oddelený z materiálu, s ktorým koexistuje v prirodzenom stave, je „izolovaný“ tak, ako sa tento termín používa v predkladanom vynáleze. Napr. pokiaľ ide o polynukleotidy, termín izolovaný znamená, že je oddelený od chromozómu a bunky, v

ktorej sa prirodzene vyskytuje. Polynukleotidy a polypeptidy sa môžu vyskytovať v kompozícii, ako sú formulácie médií, roztoky na vnášanie polynukleotidov alebo polypeptidov napr. do buniek, kompozície alebo roztoky na chemické alebo enzymatické reakcie, napr. ktoré nie sú prirodzene sa vyskytujúcimi kompozíciami, a tu sú izolované polynukleotidy alebo polypeptidy v zmysle tohto termínu, ako sa používa v predkladanom vynáleze.

„V podstate čistý“ a „v podstate homogénny“ sú vzájomne nahraditeľné termíny a označujú polypeptid RG1 alebo jeho fragmenty, alebo segment polynukleotidu, ktorý ich kóduje, pričom tento polypeptid či polynukleotid je oddelený od látok, s ktorými sa vyskytuje prirodzene. Polypeptid RG1 alebo jeho fragmenty, alebo segment polynukleotidu, ktorý ich kóduje, je v podstate jednoduchý vo všetkých komponentoch, s ktorými sa prirodzene vyskytuje, pokiaľ je oddelený od natívnych kontaminantov, s ktorými sa vyskytuje v prirodzenom stave. To znamená, že polypeptid, ktorý sa syntetizuje chemicky alebo bunkovým systémom odlišným od bunky, z ktorej prirodzene pochádza, je v podstate zbavený komponentov, s ktorými sa prirodzene vyskytuje.

„Homológny“, pokiaľ sa tento termín týka polynukleotidu, znamená, že dva polynukleotidy alebo ich vyznačené sekvencie sú optimálnym lineárnym porovnaním („alignement“) totožné so zodpovedajúcimi inzerciami či deléciami nukleotidov aspoň v 70 % nukleotidov, obvykle v 75 až 99 % a výhodnejšie v minimálne 98 až 99 % nukleotidov.

„Podobnosť“, pokiaľ sa týka polypeptidu, sa určí porovnaním aminokyselinovej sekvencie a konzervatívnych aminokyselinových náhrad jedného polypeptidu so sekvenciou druhého polypeptidu.

„Polymerázová reťazová reakcia“ teda „PCR“ označuje spôsob, pri ktorom sú špecifické úseky DNA amplifikované, ako je opísané v patente USA č. 4 683 195 udelenom 28. 7. 1987. Obvykle je potrebné poznať koncové alebo dlhšie sekvencie fragmentov požadovaného polypeptidu, aby sa mohli navrhnúť oligonukleotidové priméry; tieto priméry budú antiparalelné a budú mať totožnú či podobnú sekvenciu ako opačné vlákna templátu, ktorý má byť amplifikovaný. Nukleotidy 5' konca oboch primérov sa budú kryť s koncami amplifikovaného materiálu. PCR je možné využiť na amplifikáciu špecifických sekvencií DNA z celkovej genómovej DNA, cDNA transkribovanej z celkovej bunkovej RNA, z plazmidových sekvencií atď. (pozri všeobecne Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263, 1987; Erlich, ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989).

„Stringencia“ (hybridizačných podmienok) sa obvykle vyskytuje v rozmedzí T_m (teplota topenia) -5 °C (5 °C pod T_m sondy) do približne 20 °C až 25 °C pod T_m . Odborníkom bude zrejmé, že stringentnú hybridizáciu je možné použiť na identifikáciu alebo detekciu zhodných sekvencií polynukleotidov alebo na identifikáciu alebo detekciu podobných alebo príbuzných sekvencií polynukleotidov. Termín „stringentné podmienky“, tak ako je používaný, znamená, že hybridizácia bude prebiehať, iba pokiaľ bude medzi sekvenciami najmenej 95 % a výhodne menej 97 % identita.

„Hybridizácia“, ako sa používa, zahŕňa „akýkoľvek proces, ktorým je polynukleotidové vlákno spojené s komplementárnym vláknom na princípe párovania báz“ (Coombs, J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, N. Y., 1994).

„Terapeuticky účinná dávka“ označuje také množstvo polypeptidu alebo jeho protilátok, jeho antagonistov či inhibitorov, vrátane „antisense“ molekúl a ribozýmov, ktorá zlepši príznaky alebo podmienky chorobného stavu. Terapeutická účinnosť a toxicita týchto látok sa môže určiť štandardnými farmaceutickými spôsobmi v bunkových kultúrach či na experimentálnych zvieratách, napr. ako ED_{50} (dávka terapeuticky účinná v 50 % populácie) alebo LD_{50} (dávka letálna pre 50 % populácie). Pomer dávok s terapeutickým a toxickým účinkom sa nazýva terapeutický index a dá sa vyjadriť ako pomer ED_{50}/LD_{50} .

„Liečenie“ či „liečba“, ako sa tento termín používa, znamená liečbu chorobného stavu (ochorenia) u ľudského pacienta, pričom tento chorobný stav je spojený s rastom nádoru prostaty a zahŕňa chorobné stavy, pri ktorých je potrebné u pacienta znížiť hladinu RG1.

Podrobný opis vynálezu

Predkladaný vynález sa týka okrem iného nových polypeptidov RG1, polynukleotidov *rgl* a protilátok zameraných proti polypeptidom RG1, ako bude podrobnejšie opísané. Konkrétne sa tento vynález týka nových polypeptidov RG1 a polynukleotidov kódujúcich tieto polypeptidy RG1, najmä sa týka RG1 s aminokyselinovou sekvenciou, ktorá je uvedená na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a *rgl* s polynukleotidovou sekvenciou, ktorá je uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1). Tento vynález tiež zahŕňa varianty RG1. Výhodný variant RG1 je variant majúci najmenej 70 % podobnosť (výhodne najmenej 70 % identitu) s polypeptidovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a výhodnejšie najmenej 90 % podobnosť (výhodnejšie najmenej 90 % identitu) s polypeptidom uvedeným na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a

ešte výhodnejšie najmenej 95 % podobnosť (ešte výhodnejšie najmenej 95 % identitu) s polypeptidovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a tiež zahŕňa úseky týchto polypeptidov, pričom tieto úseky polypeptidu obvykle obsahujú najmenej 30 aminokyselín a výhodnejšie najmenej 50 aminokyselín.

5 Sekvencia kódujúca predikovaný polypeptid RG1 začína 296 bázových párov od 5' konca nukleotidovej sekvencie uvedenej na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1). RG1 obsahuje tri štrukturálne domény charakteristické pre vyššiu rodinu proteínov extracelulárneho matrixu Mindin/F-spondín: dve spondínové domény (FS1 a FS2), ktoré zahŕňajú aminokyseliny 31 až 103 a 138 až 221 a trombospodínovú doménu zahŕňajúcu aminokyseliny 278 až 330.

10 Predkladaný vynález je čiastočne založený na štrukturálnej homológii medzi RG1 a potkaním Mindinom, ďalším členom rodiny proteínov extracelulárneho matrixu, uvedeného na obr. 3. Aminokyselinová sekvencia RG1 má približne 89,7 % podobnosť s potkaním Mindinom.

15 Predkladaný vynález je tiež založený na expresnom profile RG1, ktorého expresia bola dokázaná v knižniciach prostatyckých tkanív a zvýšená expresia v knižniciach prostatyckých nádorov. Tento expresný profil v tkanivách sa pozoroval pri analýze expresie mRNA vo vzorkách normálnych a nádorových tkanív zistených analýzou PCR pomocou Taqman. Tento analytický spôsob dokázal, že expresia mRNA kódujúca RG1 je v prostatyckých tkanivách oproti iným tkanivám zvýšená.

Polynukleotidy

20 V súlade s jedným aspektom predkladaného vynálezu sú opísané izolované polynukleotidy kódujúce polypeptid RG1 s dedukovanou aminokyselinovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

25 Pomocou uvedených informácií, ako napr. polynukleotidová sekvencia uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1), možno získať polynukleotid kódujúci polypeptid RG1 uvedený v predkladanom vynáleze pomocou štandardných klonovacích a testovacích spôsobov, ako napr. klonovanie cDNA pomocou mRNA z buniek ľudských tkanív ako východiskového materiálu. Ako príklad možno uviesť fakt, že polynukleotidová sekvencia uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1) sa identifikovala v klonoch cDNA získaných z ľudských prostatyckých tkanív. Rg1 bol identifikovaný ako gén exprimovaný v prostate prehľadávaním databázy Incyte LifeSeq. Táto nukleotidová sekvencia bola identifikovaná prehľadávaním anotácií v databáze pomocou nástroja „Funkcia proteínu“ poskytnutého spoločnosťou Incyte. Táto nukleotidová sekvencia sa našla v anotovanej databáze v kategórii bunkových adhézných molekúl a bola opísaná ako homológ F-spondínu. 30 Elektronická Northern analýza distribúcie polynukleotidových sekvencií *rgl* v súbore knižníc v databáze dokázala, že vysoké hladiny expresie *rgl* boli zistené v knižniciach prostatyckých tkanív a nižšie hladiny v knižniciach mnohých iných tkanív, vrátane normálnych a nádorových.

Po zostavení súboru klonov *rgl* z databázy do sústavy kontigov polynukleotidových sekvencií a po ich úprave na súvislú sekvenciu sa identifikovala úplná kódujúca sekvencia predikovaného zostaveného polynukleotidu. Táto sekvencia kóduje proteín homológny s potkaním mindinom. 35

Klony databázy Incyte 1640796, 1712252 a 1880265 sa získali z Incyte na experimentálne účely a klon 3360733 bol identifikovaný ako obsahujúci najväčšiu časť nukleotidovej sekvencie 5' konca. Získala sa úplná sekvencia tohto klonu, ktorá obsahuje úplnú kódujúcu sekvenciu pre umelo odvodený proteín RG1. Táto sekvencia je uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1).

40 Polynukleotidy v predkladanom vynáleze môžu byť vo forme RNA, napr. mRNA alebo vo forme DNA, vrátane napr. cDNA a genómovej DNA získanej klonovaním alebo pripravené spôsobmi chemickej syntézy či kombinácie týchto spôsobov alebo spôsobmi opísanými v tomto vynáleze. DNA môže byť jednovláknová alebo dvojitá. Jednovláknová DNA môže byť kódujúcim vláknom, tiež nazývaným „sense“ vlákno alebo to môže byť nekódujúce vlákno, tiež nazývané „antisense“ vlákno.

45 Sekvencia kódujúca polypeptid môže byť zhodná s kódujúcou sekvenciou polynukleotidu uvedeného na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1). Môže to tiež byť polynukleotid s odlišnou sekvenciou, ktorý vďaka redundancii (degenerativnosti) genetického kódu kóduje polypeptid uvedený na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

Polynukleotidy predkladaného vynálezu kódujúce polypeptid uvedený na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) môžu obsahovať okrem iného sekvencie kódujúce tento samotný polypeptid; sekvencie kódujúce tento polypeptid s ďalšími nekódujúcimi sekvenciami, vrátane okrem iného napr. intrónov a nekódujúcich 5' a 3' sekvencií, ako napr. transkribované, ale netranslatované sekvencie zúčastňujúce sa transkripcie a úpravy mRNA (napr. signály na zostrih a polyadenyláciu) či ďalšie kódujúce sekvencie, ktoré kódujú ďalšie aminokyseliny, ako napr. aminokyseliny zašifrujúce ďalšie funkcie. Tak môže byť polypeptid napr. fúzovaný s markerovou sekvenciou, ako napr. s peptidom uľahčujúcim purifikáciu fúzneho polypeptidu. V určitých výhodných uskutočneniach tohto zámeru predkladaného vynálezu je markerovou sekvenciou hexahistidínový peptid, ktorý slúži ako značka pridaná pomocou vektora pTrcHisB (Invitrogen, Carlsbad, CA) a ďalšie, z ktorých mnoho je komerčne dostupných. Ako bolo opísané napr. v publikácii Gentz et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821 - 824, 1989), hexahistidín umožňuje ľahkú purifikáciu fúzaného proteínu. 50

Polynukleotidy môžu kódovať polypeptid, ktorý okrem daného polypeptidu obsahuje ďalšie aminokyselinové zvyšky na C- a N-konci alebo vnútri tohto polypeptidu (napr. keď jeho aktívna forma obsahuje viac ako 60

jeden polypeptidový reťazec). Tieto sekvencie môžu mať úlohu v úprave polypeptidu z prekursorovej na konečnú formu, môžu uľahčovať pohyb polypeptidu, môžu predlžovať či skracovať jeho polčas alebo môžu uľahčovať manipuláciu s polypeptidom pri testovaní či produkcii atď. Ako je obvyklé v situácii *in situ*, tieto ďalšie aminokyseliny môžu byť z polypeptidu odstránené proteolytickými enzýmami.

5 Predkladaný vynález sa ďalej týka variantov opísaných polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty, analógy a deriváty polypeptidu s dedukovanou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2). Variantom polynukleotidu môže byť prirodzene sa vyskytujúci variant ako napr. prirodzene sa vyskytujúci alelický variant alebo to môže byť variant, o ktorom nie je známe, že by sa vyskytoval prirodzene. Tieto varianty polynukleotidu nevyskytujúce sa prirodzene sa môžu získať technikami mutagenézy, vrátane tých, ktoré sa vy-
10 užívajú pre polynukleotidy, bunky či organizmy.

Medzi varianty v tejto súvislosti patria varianty, ktoré sa od opísaných polynukleotidov líšia substitúciami, deléciami či adíciami nukleotidov. Tieto substitúcie, delécie či adície sa môžu týkať jedného alebo viac nukleotidov. Varianty môžu byť pozmenené tak v kódujúcich, ako aj v nekódujúcich oblastiach. Zmeny v kódujúcich oblastiach môžu viesť k substitúciám, deléciám či adiciám konzervatívnych aj nekonzervatívnych
15 aminokyselín.

Medzi zvlášť výhodné uskutočnenia predkladaného vynálezu patria z tohto hľadiska polynukleotidy kódujúce polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou RG1, ako je uvedené na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2); ich varianty, analógy, deriváty či fragmenty a fragmenty týchto variantov, analógov a derivátov.

20 Ďalším zvlášť výhodným uskutočnením z tohto hľadiska sú polynukleotidy, ktoré kódujú varianty, analógy, deriváty a fragmenty RG1 a varianty, analógy a deriváty týchto fragmentov, ktorých aminokyselinová sekvencia zodpovedá sekvencii polypeptidu RG1 uvedenej na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), a kde pri väčšom počte, niekoľkých, 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 2, 1 alebo žiadnej aminokyseline došlo k substitúcii, delécii, adícii či akejkolvek kombinácii týchto javov. Zvlášť výhodnými sú substitúcie, adície a delécie bez vonkajšieho prejavu, ktoré nemenia vlastnosti a aktivity polypeptidu RG1. Zvlášť výhodnými z tohto hľadiska sú
25 tiež konzervatívne substitúcie. Najvýhodnejšími sú polynukleotidy kódujúce polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) bez substitúcií.

Ďalšími výhodnými uskutočneniami predkladaného vynálezu sú polynukleotidy majúce aspoň 70 % identitu s polynukleotidom kódujúcim polypeptid RG1 s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a polynukleotidy komplementárne k týmto polynukleotidom. Okrem nich sú vysoko
30 výhodné polynukleotidy obsahujúce oblasť vykazujúcu aspoň 80 % identitu s polynukleotidom kódujúcim polypeptid RG1 a polynukleotidy k nim komplementárne. Z tohto hľadiska sú zvlášť výhodné polynukleotidy aspoň s 90 % identitou s týmto polynukleotidom a medzi nimi sú zvlášť výhodné tie, ktoré s nim vykazujú aspoň 95 % identitu. Navyše, polynukleotidy vykazujúce aspoň 97 % identitu sú zvlášť výhodné medzi tými, ktoré vykazujú aspoň 95 % identitu a z nich sú zvlášť výhodné tie, ktoré vykazujú aspoň 98 % a 99 % identi-
35 tu, pričom tie s 99 % identitou sú najvýhodnejšie.

Z tohto hľadiska sú navyše výhodnými uskutočneniami polynukleotidy kódujúce polypeptidy, ktoré vykazujú v podstate tú istú biologickú aktivitu ako polypeptid kódovaný polynukleotidovou sekvenciou uvede-
nou na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1).

40 Predkladaný vynález sa ďalej týka polynukleotidov, ktoré hybridizujú s opísanými sekvenciami. Z tohto hľadiska sa tento vynález týka zvlášť polynukleotidov, ktoré hybridizujú za stringentných podmienok s opísanými polynukleotidmi.

Ako bude uvedené v súvislosti s testovaním polynukleotidov, ktoré sú opísané v predkladanom vynáleze, polynukleotidy z tohto vynálezu, ako sú opísané, môžu slúžiť napr. ako hybridizačné sondy pre cDNA a genómovú DNA na izoláciu klonov cDNA a genómovej DNA s úplnou dĺžkou, kódujúcich RG1 a na izoláciu
45 klonov cDNA a genómovej DNA iných génov vykazujúcich vysokú podobnosť sekvencie s génom *rgl*. Tieto sondy obvykle obsahujú najmenej 15 báz. Výhodne tieto sondy obsahujú najmenej 30 báz a môžu mať aj najmenej 50 báz.

Tak napr. kódujúcu oblasť génu *rgl* je možné izolovať skríningom knižníc pomocou syntetických oligonukleotidových sond, ktoré boli navrhnuté podľa známej sekvencie DNA. Napr. značený oligonukleotid so
50 sekvenciou komplementárnou k sekvencii polynukleotidu uvedeného v predkladanom vynáleze sa môže využiť na skríning knižnice cDNA či genómovej DNA s cieľom identifikovať klony hybridizujúce s danou sondou.

Môže sa teda zhrnúť, že polynukleotid opísaný v predkladanom vynáleze môže kódovať polypeptid a polypeptid s vedúcou „leader“ sekvenciou (ktorý môže byť označený ako „prepolypeptid“).

55 Je zrejmé, že predkladaný vynález sa okrem iného týka polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty polypeptidov, polynukleotidov hybridizujúcich s polynukleotidmi, ktoré kódujú fragmenty polypeptidov, najmä tých, ktoré hybridizujú za stringentných podmienok a polynukleotidov slúžiacich na amplifikáciu polynukleotidov, ktoré kódujú fragmenty polypeptidov ako napr. PCR priméry. Z tohto hľadiska sú výhodné polynukleotidy, ktoré zodpovedajú výhodným fragmentom polypeptidov ako budú opísané.

Polypeptidy

Predkladaný vynález sa ďalej týka polypeptidu RG1, ktorého dedukovaná aminokyselinová sekvencia je uvedená na obr. 2 (a v zozname sekvencií ako sekvencia SEQ ID NO: 2).

5 Tento vynález sa tiež týka fragmentov, analógov a derivátov týchto polypeptidov. Termíny fragment, derivát analógov, pokiaľ označujú polypeptid uvedený na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), znamenajú polypeptid majúci v podstate tú istú biologickú aktivitu ako uvedený polypeptid.

Polypeptidom uvedeným v predkladanom vynáleze môže byť rekombinantný polypeptid, prirodzený polypeptid alebo syntetický polypeptid. V niektorých výhodných uskutočneniach je ním rekombinantný polypeptid.

10 Fragmentom, derivátom alebo analógom polypeptidu uvedeného na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) môže byť (i) polypeptid, v ktorom jeden či viac aminokyselinových zvyškov bolo nahradených konzervovaným alebo nekonzervovaným aminokyselinovým zvyškom (výhodne konzervovaným aminokyselinovým zvyškom) a tento substituovaný aminokyselinový zvyšok môže alebo nemusí byť kódovaný genetickým kódom, alebo (ii) polypeptid, v ktorom jeden či viac aminokyselinových zvyškov má substituovanú skupinu alebo (iii) polypeptid, ktorý je fúzovaný s inou látkou, napr. s látkou zvyšujúcou polčas polypeptidu (ako napr. polyetylén glykol), alebo (iv) polypeptid, ku ktorému sú fúziou pripojené ďalšie aminokyseliny ako vedúce „leader“ sekvencie, sekrečné sekvencie alebo sekvencie uľahčujúce purifikáciu polypeptidu. Podľa údajov uvedených v predkladanom vynáleze by odborníci mali byť schopní pracovať s týmito fragmentmi, derivátmi a analógmi.

20 Medzi zvlášť výhodné uskutočnenia predkladaného vynálezu patria z tohto hľadiska polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou RG1 uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), ich varianty, analógy, deriváty či fragmenty a varianty, analógy či deriváty týchto fragmentov.

Výhodnými variantmi sú tie, ktoré sa od referenčného polypeptidu líšia substitúciou konzervatívnych aminokyselín. Ide o také substitúcie, ktoré nahradia danú aminokyselinu v polypeptide inou aminokyselinou s podobnými charakteristikami. Typickými konzervatívnymi substitúciami sú vzájomné nahradenia alifatických aminokyselín Ala, Val, Leu a Ile, výmena hydroxylových zvyškov Ser a Thr, výmena kyslých zvyškov Asp a Glu, substitúcia amidových zvyškov Asn a Gln, výmena bázických zvyškov Lys a Arg a výmeny medzi aromatickými zvyškami Phe a Tyr.

30 Ďalšími výhodnými variantmi, analógmi, derivátmi či fragmentmi týchto variantov, analógov či derivátov sú z tohto hľadiska tie, ktorých aminokyselinová sekvencia zodpovedá sekvencii RG1 uvedenej na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), v ktorej pri väčšom počte, niekoľkých, 5 až 10, 1 až 5, 1 až 3, 1 alebo žiadneho aminokyselinového zvyšku došlo k substitúcii, delícii či adícii alebo akejkolvek ich kombinácii. Zvlášť výhodnými sú substitúcie, adície či delécie bez vonkajších prejavov, ktoré nemenia vlastnosti a aktivity polypeptidu RG1. Z tohto hľadiska sú tiež zvlášť výhodné konzervatívne substitúcie. Najvýhodnejšie sú polypeptidy s aminokyselinovou sekvenciou uvedenou na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) bez substitúcií.

35 Polypeptidy a polynukleotidy uvedené v predkladanom vynáleze sú výhodné v izolovanej forme a purifikované do homogenity.

Polypeptidy v predkladanom vynáleze tiež zahŕňajú polypeptid uvedený na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), ako aj polypeptidy majúce aspoň 70 % podobnosť (výhodne aspoň 70 % identitu) s polypeptidom uvedeným na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a výhodnejšie aspoň 90 % podobnosť (výhodnejšie aspoň 90 % identitu) s polypeptidom uvedeným na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a ešte výhodnejšie aspoň 95 % podobnosť (ešte výhodnejšie aspoň 95 % identitu) s polypeptidom uvedeným na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a tiež zahŕňajú úseky polypeptidu obsahujúce obvykle najmenej 30 aminokyselín a výhodnejšie najmenej 50 aminokyselín.

45 Ako je známe v stave techniky, „podobnosť“ medzi dvoma polypeptidmi je určená porovnaním aminokyselínovej sekvencie a ich konzervatívnych aminokyselinových substituentov jedného polypeptidu so sekvenciou druhého polypeptidu.

Fragmenty alebo úseky polypeptidov opísaných v predkladanom vynáleze je možné využiť na prípravu zodpovedajúcich kompletných polypeptidov peptidovou syntézou; tieto fragmenty je preto možné využiť ako medziprodukty prípravy kompletných polypeptidov.

Fragmenty

Výhodným uskutočnením tohto zámeru predkladaného vynálezu sú tiež polypeptidy obsahujúce fragmenty RG1 a to najmä fragmenty RG1 uvedeného na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a fragmenty variantov a derivátov RG1 uvedeného na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

Z tohto hľadiska je fragmentom polypeptid, ktorého celková aminokyselinová sekvencia je zhodná s časťou, ale nie s celkom aminokyselínovej sekvencie uvedených polypeptidov RG1 a ich variantov a derivátov.

Tieto fragmenty môžu byť „samostatné“ alebo „voľné“, t. j. nie sú súčasťou iných polypeptidov alebo fúzané s ďalšími aminokyselinami alebo môžu byť súčasťou väčšieho polypeptidu, ktorého sú úsekom alebo oblasťou. Pokiaľ sú súčasťou väčšieho polypeptidu, tieto uvedené fragmenty najvýhodnejšie tvoria jedinu

súvislú oblasť. Jediný väčší polypeptid však môže obsahovať viac fragmentov. Napr. niektoré určité uskutočnenia sa týkajú fragmentu RG1 uvedeného v predkladanom vynáleze, ktorý je obsiahnutý v prekuzore polypeptidu určeného na expresiu v hostiteľovi, a ktorého pre- a propolypeptidové oblasti sú fúzané s N-koncom fragmentu RG1 a ďalšia oblasť je fúzaná s C-koncom tohto fragmentu. Fragment v jednom určitom význame, ktorý je mienený v tomto aspekte vynálezu, teda označuje úsek alebo úseky fúzneho polypeptidu či fúzneho proteínu odôvodneného z RG1.

Reprezentatívnymi príkladmi polypeptidových fragmentov uvedených v tomto vynáleze môžu byť tie, ktoré obsahujú približne 25 až približne 331 aminokyselín.

V tomto kontexte „približne“ zahŕňa konkrétne uvedené rozmedzie a rozmedzie väčšie alebo menšie o niekoľko, pár, 5, 4, 3, 2 alebo 1 aminokyselinu na jednej hranici rozmedzia alebo na oboch hraniciach rozmedzia. Napr. približne 331 aminokyselín v tomto kontexte znamená polypeptidový fragment od 25 plus alebo mínus niekoľko, pár, 5, 4, 3, 2 alebo 1 aminokyselinu do 331 plus alebo mínus niekoľko, pár, 5, 4, 3, 2 alebo 1 aminokyselinový zvyšok, t. j. rozmedzie široké od 25 mínus niekoľko aminokyselín do 331 plus niekoľko aminokyselín a úzke od 25 plus niekoľko aminokyselín do 331 mínus niekoľko aminokyselín.

Vysoko výhodné z tohto hľadiska sú už uvedené rozmedzia plus alebo mínus až 5 aminokyselín na ktorejkoľvek z oboch hraníc rozmedzia alebo na oboch hraniciach rozmedzia. Zvlášť vysoko výhodné sú uvedené rozmedzia plus alebo mínus až 3 aminokyseliny na ktorejkoľvek z oboch hraníc rozmedzia alebo na oboch hraniciach rozmedzia. Veľmi vysoko výhodné sú rozmedzia plus alebo mínus jedna aminokyselina na jednej či oboch hraniciach uvedených rozmedzí bez adícií či delácií. Najvýhodnejšími z tohto hľadiska sú fragmenty od približne 25 do približne 331 aminokyselín.

Zvlášť výhodnými fragmentmi v predkladanom vynáleze sú skrátené mutanty RG1. Medzi skrátené mutanty RG1 patria varianty alebo deriváty sekvencie uvedenej na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) okrem delécie súvislej série zvyškov (t. j. súvislej oblasti, časti alebo úseku) pokrývajúcej N-koniec sekvencie uvedenej na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2), alebo súvislej série zvyškov pokrývajúcej C-koniec, alebo ako je to pri dvojnásobných skrátených mutantoch, delécie dvoch súvislých sérií zvyškov, z ktorých jedna zahŕňa N-koniec a jedna C-koniec. Fragmenty s veľkosťou v uvedenom rozmedzí sú tiež výhodnými uskutočneniami skrátených fragmentov, ktoré sú medzi fragmentmi všeobecne považované za zvlášť výhodné.

Zvlášť výhodnými pre tento aspekt predkladaného vynálezu sú fragmenty vyznačujúce sa biologickými a/alebo imunologickými charakteristikami RG1. Tieto fragmenty zhŕňajú fragmenty obsahujúce vopred stanovené štrukturálne domény RG1, ktoré pokrývajú aspoň aminokyseliny 31 až 103, 138 až 221, resp. 278 až 330 alebo fragmenty využité na prípravu protilátok, napr. tie, ktoré sú opísané v príklade 4.

Niektoré oblasti výhodné z tohto hľadiska sú uvedené na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2) a zahŕňajú, ale bez obmedzenia, oblasti uvedených typov identifikované analýzou aminokyselinovej sekvencie uvedenej na obr. 2 (sekvencia SEQ ID NO: 2).

Medzi vysoko výhodné fragmenty z tohto hľadiska patria tie, ktoré obsahujú oblasti RG1, v ktorých sú kombinované určité štrukturálne charakteristiky, ako napr. tie, ktoré sú opísané. Z tohto hľadiska sú zvlášť výhodnými oblasťami dve spondínové a jedna trombospondínová oblasť, ktorá pokrýva približne aminokyseliny 31 až 103, 138 až 221, resp. 278 až 330, ktoré sú charakteristické pre vyššiu rodinu Mindin/spondin proteínov extracelulárneho matrixu. Tieto oblasti môžu byť súčasťou väčšieho polypeptidu, alebo môžu samy osebe predstavovať výhodný fragment predkladaného vynálezu, ako už bolo opísané. Je zrejmé, že termín „približne“, ako je použitý v tomto odseku má uvedený význam, ktorý sa týka fragmentov všeobecne.

Ďalšími výhodnými oblasťami sú oblasti zaisťujúce aktivity RG1. Najvýhodnejšími z tohto hľadiska sú fragmenty majúce chemickú, biologickú či inú aktivitu RG1, vrátane tých, ktoré majú podobnú alebo vyššiu aktivitu tohto typu, alebo majú zníženú nežiaducu aktivitu. Vysoko výhodné z tohto hľadiska sú fragmenty obsahujúce oblasti so sekvenciou či pozíciou, alebo sekvenciou aj pozíciou homológou s aktívnymi oblasťami príbuzných polypeptidov, ako napr. iné proteíny rodiny Mindinov, vrátane RG1.

Vektory, hostiteľské bunky a expresné systémy

Predkladaný vynález sa tiež týka vektorov, medzi ktoré patria polynukleotidy uvedené v tomto vynáleze, hostiteľské bunky, ktoré sú obvykle geneticky modifikované pomocou vektorov uvedených v tomto vynáleze a prípravy polypeptidov uvedených v tomto vynáleze rekombinantnými metódami. Tieto metódy sú opísané v publikáciách Sambrook et. al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y., 1989, a Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1989.

Hostiteľské bunky môžu byť geneticky modifikované na vnášanie polynukleotidov uvedených v tomto vynáleze a ich expresiu. Polynukleotidy môžu byť vnesené do hostiteľských buniek napr. pomocou dobre známych spôsobov infekcie, transdukcie, transfekcie, transvekcie (transvection) a transformácie. Polynukleotidy môžu byť vnesené samostatne alebo s inými polynukleotidmi. Tieto ďalšie polynukleotidy môžu byť vnesené nezávisle, spoločne alebo v spojení s polynukleotidmi tohto vynálezu.

Tak môžu napr. byť pomocou štandardných spôsobov kotransfekcie a selekcie, napr. v bunkách cicavcov, vnesené polynukleotidy uvedené v tomto vynáleze do hostiteľských buniek s inými oddelenými polynukleotidmi, ktoré kódujú selektovateľný marker. V tomto prípade budú obvykle polynukleotidy stabilne zabudované do genómu hostiteľskej bunky.

- 5 V inom prípade môžu byť polynukleotidy určené na propagáciu v hostiteľovi spojené s vektorom obsahujúcim selektovateľný marker. Vektorový konštrukt môže byť vnesený do hostiteľskej bunky zmienenými spôsobmi. Plazmidový vektor sa obvykle vnáša ako DNA v precipitáte, napr. ako precipitát fosforečnanu draselného alebo v komplexe s lipidickým iónom. Na vnesenie polynukleotidu do hostiteľa sa môže tiež využiť elektroporácia. Pokiaľ je vektorom vírus, môže byť zabalený *in vitro* alebo vnesený do zbaľujúcej bunkovej
- 10ovej línie a zabalený vírus môže byť transdukciou vnesený do buniek. Odborníkom je dobre známy celý rad rutinne využívaných spôsobov prípravy polynukleotidov a vnášania polynukleotidov do buniek podľa potrieb tohto aspektu predkladaného vynálezu. Tieto spôsoby sú podrobne opísané v uvedenej publikácii Sambrook et al., ktorá je príkladom z mnohých laboratórnych príručiek detailne opisujúcich tieto spôsoby. V súlade s týmto aspektom predkladaného vynálezu môže byť vektorom napr. plazmidový vektor, jednovláknový alebo
- 15dvojitý vláknový fágový vektor, jednovláknový či dvojitý vláknový RNA či DNA vírusový vektor. Tieto vektory môžu byť vnášané do buniek ako polynukleotidy, výhodne ako DNA, dobre známymi spôsobmi na vnášanie DNA a RNA do buniek. V prípade fágových a vírusových vektorov môžu byť a výhodne aj sú tieto vektory vnášané do buniek ako prirodzene či umelo zbalený vírus dobre známymi spôsobmi infekcie a transdukcie. Vírusové vektory môžu byť schopné či neschopné samostatnej replikácie. Pokiaľ sú replikačne defektné,
- 20propagácia vírusu obvykle prebieha iba v komplementujúcich hostiteľských bunkách.

- Výhodnými vektormi sú v určitých ohľadoch vektory na expresiu polynukleotidov a polypeptidov uvedených v predkladanom vynáleze. Tieto vektory obvykle obsahujú intramolekulárne pôsobiace kontrolné oblasti na expresiu v hostiteľovi podľa potreby spojené s polynukleotidom, ktorý má byť exprimovaný. Zodpovedajúce intermolekulárne pôsobiace faktory sú poskytnuté buď hostiteľom, alebo komplementujúcim vektorom, či samotným vektorom pri vnášaní do hostiteľa.
- 25

- V určitých z tohto hľadiska výhodných uskutočneniach vektory umožňujú špecifickú expresiu. Takouto špecifickou expresiou môže byť indukovateľná expresia či expresia iba v určitých typoch buniek alebo oboje, expresia indukovateľná iba v určitých typoch buniek. Medzi zvlášť výhodné indukovateľné vektory patria vektory, ktorých expresiu je možné indukovať faktormi prostredia, ktoré je možné ľahko ovplyvňovať, ako
- 30napr. teplota a nutričné prídavky. Rad vektorov vhodných na tento zámer predkladaného vynálezu, vrátane vektorov na konštitutívnu alebo indukovateľnú expresiu v prokaryotických či eukaryotických bunkách, je dobre známy a rutinne využívaný odborníkmi.

- Geneticky modifikované hostiteľské bunky sa môže kultivovať v konvenčnom živnom médiu, ktoré môže byť podľa potreby upravené napr. na aktiváciu promótorov, selekciu transformantov alebo amplifikáciu génov. Kultivačné podmienky, ako napr. teplota, pH a pod., predtým použité na kultiváciu hostiteľskej bunky vybranej na expresiu všeobecne, budú vhodné na expresiu polypeptidov podľa predkladaného vynálezu a odborníci ich ľahko odvodí.
- 35

- Na expresiu polypeptidu predkladaného vynálezu je možné využiť množstvo rôznych expresných vektorov. Medzi tieto vektory patria chromozomálne, epizomálne alebo od vírusové odvodené vektory, napr. vektory odvodené z bakteriálnych plazmidov, bakteriofágov, kvasinkových epizómov, kvasinkových chromozomálnych elementov, z vírusov, ako sú bakulovírusy, papovavírusy ako SV40, vírusy kravských kiahní, adenovírusy, vírus kiahní hydiny, vírusy pseudobesnoty, retrovírusy a alfavírusy, ako je vírus Sindbis a vektory odvodené z ich kombinácií, ako napr. vektory odvodené z plazmidových a bakteriofágových genetických elementov, ako sú kozmidy a „phagemidy“, všetky tieto vektory sa môžu využiť na expresiu v súlade s týmto aspektom predkladaného vynálezu. Z tohto hľadiska je možné využiť na expresiu polypeptidu v hostiteľovi
- 40akýkoľvek vektor, ktorý je schopný niesť, množiť či exprimovať nejaký polynukleotid.

- Zodpovedajúca sekvencia DNA môže byť vložená do vektora akýmkoľvek z celého radu dobre známych a rutinne využívaných spôsobov. Sekvencia DNA, ktorá má byť exprimovaná, je obvykle spojená s expresným vektorom pomocou štiepenia sekvencie DNA a expresného vektora jednou či viac reštrikčnými endonukleázami a potom spojením reštrikčných fragmentov pomocou DNA ligázy T4. Spôsoby štiepenia a ligácie, ktoré sa môžu na tento účel využiť, sú dobre známe a rutinne využívané odborníkmi. Spôsoby vhodné na tieto účely a na konštrukciu expresných vektorov pomocou alternatívnych techník, ktoré sú tiež dobre známe a rutinne využívané odborníkmi, sú objasnené v publikácii Sambrook et al., ktorá je tu uvedená na inom mieste.
- 50

- Sekvencia DNA v expresnom vektore je podľa potreby spojená s vhodnou sekvenciou (vhodnými sekvenciami) na kontrolu expresie, ako napr. promótorom riadiacim transkripciu mRNA. Príklady takýchto promótorov sú PL promótor λ fága, promótor *E. coli*, *lac*, *trp*, *tac* a *trc*, skorý a neskorý promótor SV40 a promótor retrovírusových LTR, aby sa uviedlo aspoň niekoľko dobre známych promótorov. Je zrejmé, že mnoho promótorov, ktoré tu nie sú uvedené, je vhodných na použitie v tomto aspekte predkladaného vynálezu.
- 55

zu, a sú dobre známe a môžu byť ľahko využité odborníkmi podľa opisu a príkladov uvedených v tomto vynáleze.

Expresné vektory obvykle obsahujú miesta na iniciáciu transkripcie a terminácie a v transkribovanej oblasti majú ribozómové väzbové miesto na transláciu. Kódujúci úsek transkriptov exprimovaný konštruktmí obsahuje na začiatku kodón AUG na iniciáciu transkripcie a na konci vhodne umiestnený terminačný kodón pre polypeptid, ktorý má byť translatovaný.

Okrem toho môžu konštrukty obsahovať kontrolné oblasti, ktoré regulujú aj vyvolávajú expresiu. V súlade s mnohými bežne používanými spôsobmi tieto oblasti obvykle fungujú tak, že zaisťujú kontrolu transkripcie ako napr. väzbové miesta pre represory a enhancery.

Vektory na propagáciu (množenie) a expresiu obvykle obsahujú selektovateľné markery. Tieto markery môžu byť tiež využité na ich amplifikáciu alebo môžu s týmto cieľom obsahovať iné markery. Z tohto hľadiska expresné vektory obsahujú výhodne jeden či viac selektovateľných markerových génov, poskytujúcich fenotypovú charakteristiku na selekciu transformovaných hostiteľských buniek. Výhodnými markermi sú pre eukaryotické bunky napr. rezistencia na dihydrofolátreduktázu, neomycín, puromycín či hydromycín a na kultiváciu *E. coli* a iných baktérií gény pre rezistenciu na tetracyklín, teomycín, kanamycín či ampicilín.

Vektor, ktorý obsahuje vhodnú sekvenciu DNA, ako je opísaná inde v predkladanom vynáleze, ako aj vhodný promótor a ďalšie vhodné kontrolné sekvencie, sa môže vnieť do vhodného hostiteľa pomocou množstva dobre známych vhodných spôsobov na zaistenie exprese požadovaného polypeptidu v tomto hostiteľovi. Medzi reprezentatívne príklady vhodných hostiteľov patria bakteriálne bunky, ako napr. *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; bunky húb ako kvasinkové bunky; bunky hmyzu ako *Drosophila* S2 a *Spodoptera* Sf9, živočíšne bunky ako CHO, COS a bunky Bowesovho melanómu; a rastlinné bunky; výhodne hmyzie bunky BTI-TN-5B1-4. Je známy celý rad hostiteľov na expresné konštrukty a odborníci by mali byť schopní pomocou uvedených informácií vybrať hostiteľa na expresiu polypeptidov pre účely tohto aspektu predkladaného vynálezu.

Na expresiu je možné využiť celý rad cicavčích systémov tkanivových kultúr. Medzi príklady cicavčích expresných systémov patria bunkové línie opičích obličkových fibroblastov COS-7 (Gluzman et al., Cell 23: 175, 1991). Ďalšie bunkové línie schopné exprimovať kompatibilný vektor, sú napr. bunkové línie C127, 3T3, CHO, HeLa, ľudské obličkové bunky 293 a BHK. V cicavčích hostiteľských bunkách môže byť využitý rad vírusových expresných systémov. Pokiaľ sa ako expresný vektor použije adenovírus, polynukleotidová sekvencia kódujúca RG1 sa môže ligovať do adenovírusového komplexu na transkripciu/transláciu, zloženého z neskorého promótoru a trojdielnej vedúcej „leader“ sekvencie. Vnesením do postrádateľných oblastí vírusového genómu E1 či E3 sa získa životaschopný vírus schopný exprimovať RG1 v infikovaných hostiteľských bunkách (Logan a Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655 - 59, 1984). Navyše môžu byť na zosilnenie exprese v cicavčích hostiteľských bunkách využité enhancery transkripcie ako napr. enhancer vírusu Rousovho sarkómu (RVS).

Predkladaný vynález tiež konkrétnejšie uvádza rekombinantné konštrukty, ako napr. expresné konštrukty, ktoré obsahujú jednu alebo viac opísaných sekvencií. Tieto konštrukty obsahujú vektor, napr. plazmidový alebo vírusový, do ktorého sa vložila sekvencia uvedená v tomto vynáleze. Sekvencia môže byť vložená v priamom či opačnom smere. V niektorých, z tohto hľadiska výhodných, uskutočneniach konštrukt ďalej obsahuje regulačné sekvencie ako napr. promótor, podľa potreby spojený s danou sekvenciou. Odborníkom je známy celý rad vhodných vektorov a existuje mnoho komerčne dostupných vektorov využiteľných na účely predkladaného vynálezu.

Ako príklad sú tu uvedené nasledujúce komerčne dostupné vektory. Medzi vektory výhodne využiteľné v baktériách patria pQE70, pQE60 a pQE-9 od firmy Qiagen USA (Valencia, CA); vektory pBS, Phagescript®, Bluescript®, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A od firmy Stratagene (LaJolla, CA); a ptc99a, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 od firmy Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Najvýhodnejší je vektor pTrcHisB od firmy Invitrogen. Medzi výhodné eukaryotické vektory patrí pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXTI a pSG od firmy Stratagene; a PSVK3, pBPV, pMSG a pSVL od firmy Pharmacia Biotech. Najvýhodnejší je vektor pCIneo od firmy Promega. Tieto vektory sú uvedené iba ako ilustratívne príklady mnohých komerčne dostupných a dobre známych vektorov, ktoré majú odborníci k dispozícii a môžu ich využiť na účely predkladaného vynálezu. Je zrejmé, že akýkoľvek iný plazmid alebo vektor, vhodný napr. na vnesenie, uchovanie, propagáciu alebo expresiu polynukleotidu či polypeptidu uvedeného v tomto vynáleze v hostiteľovi, sa môže využiť na účely predkladaného vynálezu.

Promótorovú oblasť je možné selektovať z akéhokoľvek požadovaného génu pomocou vektorov, ktoré obsahujú reportérovú transkripčnú jednotku a chýbajúcu promótorovú oblasť, ako napr. chloramfenikolacetyltransferázová („cat“) transkripčná jednotka, ktorá je umiestnená za reštrikčným miestom alebo miestami na vloženie kandidátneho promótorového fragmentu, t. j. fragmentu, ktorý by mohol obsahovať promótor. Ako je dobre známe, vloženie fragmentu obsahujúceho promótor do reštrikčného miesta vektora pred gén *cat* spôsobí, že sa prejaví aktivita CAT, ktorá môže byť stanovená štandardnými testami na CAT. Vektory vhodné na tento účel sú dobre známe a dostupné. Dvoma takýmito vektormi sú pKK232-B a pCM7. Promótory na

expresiu polynukleotidov predkladaného vynálezu sú teda nielen dobre známe a dostupné promótoory, ale tiež promótoory, ktoré je možné pripraviť existujúcimi spôsobmi pomocou reportérových génov.

Medzi známe bakteriálne promótoory vhodné na expresiu polynukleotidov a polypeptidov na účely predkladaného vynálezu patria promótoory *E. coli lacI* a *lacZ*, promótoory T3 a T7, promótor T5 tac, lambda PR, PL promótoory, promótor *trp* a hybridný promótor *trc*, ktorý je odvodený z promótorov *trp* a *lac*. Známymi eukaryotickými promótoormi vhodnými na tieto účely sú veľmi skorý promótor CMV, tymidínkinázový promótor HSV, skorý a neskorý promótor SV40, promótoory retrovírusových LTR, ako napr. z vírusu Rousovho sarkómu (RVS) a metalotioneínové promótoory, ako napr. promótor myšieho metalotioneínu-I.

Selekcia vhodných vektorov a promótorov na expresiu v hostiteľskej bunke je dobre známa a potrebné spôsoby na konštrukciu vektorov, vnesenie vektora do hostiteľa a expresiu v hostiteľovi sú odborníkmi rutinne využívané.

Rekombinantné expresné vektory obvykle obsahujú počiatok replikácie, promótor odvodený z vysoko exprimovaného génu na riadenie transkripcie štruktúrnej sekvencie, ktorá sa nachádza za ním a selektovateľný marker umožňujúci izoláciu buniek, ktoré obsahujú vektor po ich vystavení pôsobeniu vektorov.

Predkladaný vynález sa tiež týka už opísaných hostiteľských buniek, ktoré obsahujú už zmienené konštrukty. Hostiteľskou bunkou môže byť vyššia eukaryotická bunka, napr. cicavčia, alebo nižšia eukaryotická bunka, napr. kvasinka, alebo hostiteľskou bunkou môže byť prokaryotická bunka, napr. bakteriálna. Konštrukty vnesené do hostiteľských buniek sa môžu využiť konvenčným spôsobom na produkciu génového produktu, ktorý je kódovaný rekombinantnou sekvenciou.

Polypeptidy sa môžu exprimovať v cicavčích bunkách, kvasinkách, baktériách alebo iných bunkách pod kontrolou vhodných promótorov. Na produkciu týchto proteínov pomocou RNA odvodených z konštruktov DNA uvedených v predkladanom vynáleze sa tiež môžu využiť bezbunkové translačné systémy. Vhodné klonovacie a expresné vektory na využitie v prokaryotických a eukaryotických hostiteľoch sú opísané v publikácii Sambrook et al., ktorá je tu uvedená na inom mieste.

Transkripcia DNA, ktorá kóduje polypeptid uvedený v predkladanom vynáleze, vyššími eukaryotickými bunkami môže byť zosilnená vložением enhancerovej sekvencie do vektora. Enhancery sú intramolekulárne pôsobiace elementy DNA, obvykle o 10 - 300 bp, ktorých funkciou je zosilňovať transkripčnú aktivitu promótoru v danom hostiteľskom bunkovom type. Príkladom enhancerov je enhancer SV40, ktorý je umiestnený v neskoršej časti od počiatku replikácie medzi bp 100 a 270, ďalej skorý cytomegalovírusový enhancer, enhancer polyómového vírusu umiestnený v neskoršej časti od počiatku replikácie a ďalej adenovírusové enhancery.

Polynukleotidy uvedené v tomto vynáleze, ktoré kódujú heterológnu štruktúrnú sekvenciu polypeptidu podľa vynálezu, sa obvykle vkladajú do vektora pomocou štandardných techník, pričom sú operabilne spojené s expresným promótorom. Polynukleotid je umiestnený tak, aby bol počiatok transkripcie umiestnený v správnej pozícii 5' od ribozóm viažuceho miesta. Ribozóm viažuce miesto je umiestnené v pozícii 5' od kodónu AUG, ktorý iniciuje transláciu polypeptidu, ktorý má byť exprimovaný. Medzi ribozóm viažucim miestom a iniciačným kodónom AUG obvykle nie je žiadny ďalší otvorený čítací rámec, ktorý začína iniciačným kodónom AUG. Na konci polypeptidu je tiež obvykle umiestnený kodón na termináciu translácie a na 3' konci transkribovanej oblasti sa tiež nachádza zodpovedajúcim spôsobom umiestnený polyadenylačný signál a signál na termináciu transkripcie.

Na sekréciu translatovaného proteínu do lumenu endoplazmatického retikula, do periplazmatického priestoru alebo do extracelulárneho prostredia môžu byť do exprimovaného polypeptidu zabudované zodpovedajúce sekrečné signály. Týmito signálmi môžu byť endogénne signály daného polypeptidu alebo to môžu byť heterológne signály. Polypeptid môže byť exprimovaný v pozmenenej forme, napr. ako fúzny proteín a môže obsahovať nielen sekrečné signály, ale tiež ďalšie heterológne funkčné oblasti. Tak môže byť napr. na N-koniec polypeptidu pripojená oblasť ďalších aminokyselín, najmä tých, ktoré nesú náboj, aby tak bola zvýšená stabilita a schopnosť pretrvávania v hostiteľskej bunke pri purifikácii alebo pri ďalšej manipulácii a skladovaní. Môžu byť tiež pripojené ďalšie špeciálne oblasti na uľahčenie purifikácie polypeptidu. Tieto oblasti môžu byť pred konečnou prípravou polypeptidu odstránené. Pripojenie peptidových oblastí na polypeptidy, napr. s cieľom vyvolať sekréciu či exkréciu, na zlepšenie stability a na uľahčenie purifikácie, sú bežné známe a rutinné spôsoby. Napr. v prípade potreby väčšieho množstva RG1 na indukciu protilátok, môžu byť potrebné vektory, ktoré zaisťujú vysokú hladinu exprese ľahko purifikovateľných fúznych proteínov. Medzi týmito vektormi je možné uviesť okrem iného multifunkčné klonovacie a expresné vektory *E. coli*, ako napr. Bluescript® (Stratagene), kde kódujúca sekvencia *rgl* môže byť do vektora ligovaná v čítacom rámci so sekvenciou N-koncového Met a ďalších 7 zvyškov (β -galaktozidázy, takže vzniká hybridný proteín; vektory pIN (Van Heede a Shuster, J. Biol. Chem. 264: 5503 - 5509, 1989) a pod. Vektory PtrcHis (Invitrogen, Carlsbad, CA) je možné využiť na expresiu cudzorodých polypeptidov a fúznych proteínov, ktoré obsahujú polyhistidínovú (6x His) značku pre ľahkú purifikáciu. Proteíny produkované v týchto systémoch sú navrhnuté tak, aby obsahovali štiepne miesta, napr. štiepne miesto pre enterokinázu, takže klonovaný polypeptid sa môže vyštiepiť z fúznej peptidovej časti podľa potreby.

Po transformácii vhodného hostiteľského kmeňa a namnožení hostiteľského kmeňa do potrebnej bunkovej hustoty je možné zodpovedajúcim spôsobom indukovať indukovateľné promótoory, ak sú prítomné (napr. zmenou teploty či pridaním chemického induktora) a potom bunky ďalej kultivovať.

Potom sa bunky obvykle odoberú centrifugáciou, rozrušia fyzickou alebo chemickou cestou a výsledný hrubý extrakt sa uchováva na ďalšiu purifikáciu.

Mikrobiálne bunky využité na expresiu proteínov sa môžu rozrušiť akýmkoľvek vhodným spôsobom, vrátane cyklického zmrazovania a rozmrazovania, ultrazvukom, mechanickým rozrušením, alebo využitím látok, ktoré vyvolávajú lýzu buniek; tieto spôsoby sú odborníkom známe.

Polypeptid RG1 sa môže získať a purifikovať z kultúr rekombinantných buniek dobre známymi spôsobmi, napr. precipitáciou síranom amónnym či etanolom, kyslou extrakciou, chromatografiou na ionoménich a fosfocelulóze, chromatografiou, ktorá využíva hydrofóbne interakcie, afinitnú chromatografiu, chromatografiu na hydroxyapatite a lektínovú chromatografiu. Najvýhodnejšou purifikáciou je chromatografia HPLC (high performance liquid chromatography). Pokiaľ je polypeptid počas izolácie a purifikácie denaturovaný, je možné na obnovu jeho aktívnej konformácie využiť dobre známe spôsoby obnovy molekulárneho usporiadania proteínov. Medzi mnohé dobre známe spôsoby purifikácie proteínov je možné uviesť tie, ktoré sú opísané v publikáciách Deutscher, M., *Methods in Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, San Diego, 1982; a Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982.

Polypeptidy uvedené v predkladanom vynáleze je tiež možné pripraviť priamou syntézou peptidov spôsobmi, ktoré využívajú látky v pevnej fáze (Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1969; Merrifield, J., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 - 2154, 1963). Syntéza proteínov *in vitro* sa môže uskutočňovať ručne alebo automatizovane. Automatizovaná syntéza sa môže uskutočňovať napr. pomocou syntetizátora Applied Biosystems 413A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, Calif) podľa návodu výrobcu. Rôzne fragmenty RG1 sa môžu chemicky syntetizovať každý zvlášť a potom kombinovať chemickými spôsobmi na kompletné molekuly.

Medzi polypeptidy uvedené v predkladanom vynáleze patria prirodzene purifikované produkty, produkty chemických syntetických spôsobov a produkty získané rekombinantnými spôsobmi z buniek prokaryotických či eukaryotických hostiteľov, napr. z baktérií, kvasiniek, buniek vyšších rastlín, hmyzích buniek či cicavčích buniek. V závislosti od hostiteľa, ktorý sa použil pri spôsobe rekombinantnej prípravy, môžu byť polypeptidy uvedené v tomto vynáleze glykozylované či neglykozylované. Navyše môžu tieto polypeptidy tiež obsahovať modifikovaný počiatočný metionínový zvyšok, niekedy ako dôsledok procesov, za ktoré je zodpovedný hostiteľ.

Použitie polypeptidov RG1 a polynukleotidov, ktoré ich kódujú

Polynukleotidy *rgl* a polypeptidy RG1 sa môžu využiť na účely predkladaného vynálezu v množstve aplikácií, najmä tých, ktoré využívajú chemické a biologické vlastnosti RG1. Ďalšie aplikácie sa týkajú diagnostiky a liečby chorôb zhubného bujnenia, napr. rakoviny prostaty. Tieto aspekty predkladaného vynálezu sú diskutované v nasledujúcom texte a sú tiež opísané ďalej v opise.

Dôvod na použitie polynukleotidových a polypeptidových sekvencií v predkladanom vynáleze je založený čiastočne na chemickej a štruktúrnej homológii medzi opísaným RG1 a inými molekulami extracelulárneho matrixu, a ďalej na prevládajúcej expresii RG1 v prostatických tkanivách v porovnaní s inými tkanivami. RG1 je možné využiť na diagnostiku a liečbu stavov, porúch či chorôb spojených s abnormálnym rastom prostatického tkaniva. Tými sú napr. rakovina a metastatické nádorové bujnenie, ale aj iné choroby.

Polynukleotidové sekvencie *rgl* je možné využiť ako sondy DNA a ako ciele na „*antisense*“ či ribozýmovú liečbu, alebo ako templáty na prípravu „*antisense*“ polynukleotidov.

Polypeptidy RG1 je možné využiť na prípravu protilátok proti RG1, ktoré môžu slúžiť na detekciu hladiny polypeptidu RG1 v bunkách a tkanivách a na zacielenie liečiv do primárnych a metastatických nádorov.

Polypeptidy RG1 sa môžu využiť na stimuláciu imunitnej odpovede buniek obsahujúcich RG1.

Polynukleotidy kódujúce RG1 sa môžu využiť na diagnostické testy na detekciu hladiny polynukleotidov kódujúcich RG1 v bunkách a tkanivách.

Pri stavoch spojených s expresiou RG1, napr. pri rakovine prostaty, môže byť výhodné potlačiť expresiu či aktivitu RG1. Expresia RG1 môže byť potlačená podaním „*antisense*“ oligonukleotidov alebo ribozýmov. Je možné tiež podávať protilátky špecificky rozpoznávajúce oblasti polypeptidu RG1 zodpovedné za jeho aktivitu, a tak liečiť choroby či stavy spojené s aktivitou RG1.

Polynukleotidové testy

Predkladaný vynález sa tiež týka použitia polynukleotidov, ktoré sú príbuzné *rgl* na detekciu komplexných polynukleotidov, napr. ako diagnostických činidiel. Detekcia polynukleotidov *rgl* spojených s chorobným stavom môže slúžiť ako nástroj na vývoj diagnostických spôsobov *in vivo* a *in vitro*, ktoré môžu zlepšiť alebo určiť diagnózu choroby alebo náchylnosť na chorobu, ktorá je výsledkom tkanivovo špecifickej expresie RG1.

Jedinci s mutáciami génu, ktorý kóduje RG1, môžu byť identifikovaní na úrovni DNA množstvom spôsobov. Vzorky polynukleotidov na diagnostiku sa môžu získať z pacientových buniek, napr. z krvi, moču, slín, biopsie tkaniva či pitevných materiálov. Genómová DNA sa môže využiť na priamu detekciu alebo sa môže pred analýzou enzymaticky amplifikovať pomocou PCR (Saiki et al., Nature 324: 163 - 166, 1986).
 5 Takto je možné tiež využiť RNA alebo cDNA. Ako príklad je možné uviesť využitie PCR primérov komplementárnych k polynukleotidovej sekvencii kódujúcej RG1 na identifikáciu a analýzu exprese a mutácií *rgl*. Delécie a inzercie je možné napr. zaistiť zmenami veľkosti amplifikovaného produktu oproti normálnemu genotypu. Bodové mutácie je možné určiť hybridizáciou amplifikovanej DNA rádioaktívne značenou RNA *rgl* alebo pomocou rádioaktívne značených „*antisense*“ sekvencií DNA *rgl*. Dokonale môžu byť odlišné zodpovedajúce sekvencie od nezodpovedajúcich duplexov štiepením Rnázou A alebo rozdielmi v teplote topenia.

Rozdiely v sekvencii medzi referenčným génom a mutovanými génmi sa môžu tiež zistiť priamym sekvenovaním DNA. Klonované segmenty DNA sa môžu tiež využiť ako sondy na detekciu špecifických segmentov DNA. Citlivosť týchto spôsobov môže byť značne zvýšená vhodným využitím PCR alebo inými amplifikačnými spôsobmi. Napr. sekvenovací primér sa používa s dvojvláknovým produktom PCR alebo jednovláknovou molekulou templátu pripravenou modifikovanou reakciou PCR. Sekvencia je určená konvenčnými spôsobmi pomocou rádioaktívne značených polynukleotidov či automatickými sekvenčnými spôsobmi pomocou fluorescenčných značiek.

Genetické testy založené na rozdieloch sekvencií DNA sa môžu uskutočňovať na základe detekcie zmien elektroforetickej pohyblivosti fragmentov DNA v géloch, za prítomnosti denaturačných činidiel alebo bez nich. Malé sekvenčné delécie a inzercie sa môžu zviditeľniť gélovou elektroforézou s vysokou odlišiteľnosťou. Fragmenty DNA rôznych sekvencií môžu byť odlišené na denaturačných formamidových gradientových géloch, kde pohyblivosť rôznych fragmentov DNA je v géli spomalená v rôznych miestach, ktoré zodpovedajú ich špecifickej teplote topenia alebo čiastočného topenia (pozri napr. Myers et al., Science 230: 1242, 1985).

Zmeny sekvencie na rôznych miestach sa môžu tiež identifikovať pomocou nukleázových ochranných testov (nuclease protection assays), ako je ochrana pred RNázou a S1 alebo spôsobom chemického štiepenia (pozri napr. Catton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397 - 4401, 1985).

Detekcia špecifickej sekvencie DNA sa teda môže uskutočňovať spôsobmi, ako je hybridizácia, ochrana pred RNázou, chemické štiepenie, priame sekvenovanie DNA alebo využitím restriktčných enzýmov (napr. testovanie polymorfizmu dĺžky restriktčných fragmentov (RFLP) a Southern blotting genómovej DNA).

Okrem konvenčnejších spôsobov, ako je gélová elektroforéza alebo sekvenovanie DNA, je možné uskutočňovať detekciu mutácií tiež analýzou *in situ*.

35 Polypeptidové testy

Predkladaný vynález sa tiež týka diagnostických spôsobov, ako sú kvantitatívne a diagnostické testy na detekciu hladiny polypeptidu RG1 v bunkách, tkanivách a telesných tekutinách, ktoré zahŕňajú určenie normálnej a abnormálnej hladiny. Tak napr. diagnostický test podľa predkladaného vynálezu, ktorý slúži na detekciu zvýšenej exprese polypeptidu RG1 oproti normálnym vzorkám tkaniva, sa môže využiť na detekciu výskytu neoplázie, napr. rakoviny prostaty. Tieto diagnostické testy sa môžu tiež využiť na detekciu metastatického nádorového rastu. Testovacie spôsoby, ktoré je možné využiť na určenie hladiny nejakého polypeptidu, napr. polypeptidu RG1 uvedeného v tomto vynáleze, vo vzorke odvodené od hostiteľa, sú odborníkom dobre známe. Tieto testovacie spôsoby zahŕňajú rádioimunologické testy (RIA), kompetitívne väzbové testy, analýzu Western blot a testy ELISA („enzyme-linked immunoabsorbant assay“), ďalej fluorescenčné bunkové triedenie (FACS), z ktorých sa najčastejšie používa test ELISA. Pri teste ELISA sa najskôr pripraví protilátka špecifická pre RG1, výhodne monoklonálna protilátka. Okrem toho sa obvykle pripraví reportérová protilátka, ktorá sa viaže na monoklonálnu protilátku. Reportérová protilátka sa pripojí na identifikovanú látku, ako napr. na rádioaktívnu, fluorescenčnú či enzymatickú látku, v tomto prípade na enzým chrenová peroxidáza.

Pri uskutočňovaní testu ELISA sa z hostiteľa odoberie vzorka a inkubuje sa na pevnom nosiči, napr. na polystyrénovej doštičke, kde sa ukotvia polypeptidy zo vzorky. Všetky voľné väzbové miesta na doštičke sa potom blokujú inkubáciou s nešpecifickým proteínom, ako je bovinný sérový albumín. Potom sa monoklonálna protilátka inkubuje na doštičke, pričom sa na polypeptidy RG1 ukotvené na polystyrénovej doštičke naviažu monoklonálne protilátky. Naviazaná monoklonálna protilátka sa vymyje pufrom. Reportérová protilátka viazaná na chrenovú peroxidázu sa nanesie na doštičku, takže reportérová protilátka sa naviaže na ktorúkoľvek monoklonálnu protilátku viazanú na RG1. Nenaviazaná reportérová protilátka sa potom vymyje. Potom sa na doštičku pridajú látky na zistenie peroxidázovej aktivity, vrátane substrátu pre farebnú reakciu. Imobilizovaná peroxidáza viazaná na RG1 cez primárne a sekundárne protilátky vyvolá farebnú reakciu. Sila farebnej reakcie v určitých časových intervaloch označuje množstvo polypeptidu RG1, ktorý je prítomný vo vzorke. Kvantitatívne výsledky sa obvykle vyhodnocujú referenčným porovnaním so štandardnou krivkou.

Kompetitívny test je možné uskutočňovať kedykoľvek, keď je protilátka špecifická pre RG1 ukotvená na pevnom nosiči, a keď značený RG1 a vzorka odvodená z hostiteľa sa nanesie na pevný nosič, pričom množstvo značiacej látky ukotvenej na pevnom nosiči je potom možné korelovať s množstvom RG1 vo vzorke.

Tento test a ďalšie sú opísané okrem iného v publikáciách Hamptom et. al. (Serological Methods a Laboratory Manual, APS Press, St. Paul, Minn, 1990) a Maddos et al. (J. Exp. Med. 158: 12111, 1983).

Protilátky

Predkladaný vynález sa ďalej týka protilátok, ktoré špecificky viažu RG1 a sú označené ako protilátky proti RG1. Zvýšená expresia RG1 v tkanivách prostaty a jeho výskyt na povrchu bunky sú výbornými markernými charakteristikami (značkami) na skrining, diagnostiku, určenie prognózy, testovanie pri dlhodobom sledovaní a na zobrazovacie spôsoby. Navyše tieto charakteristiky naznačujú, že by RG1 mohol byť výborným cieľom pre terapeutické spôsoby, ako je cieľná liečba protilátkami, imunoterapia a génová terapia. Termín „špecificky viaže“, ako je používaný, znamená interakciu protilátky s polypeptidom, kde táto interakcia závisí od prítomnosti konkrétnej štruktúry (t. j. antigénneho determinantu či epitopu) na polypeptide; inými slovami protilátka rozpoznáva a viaže skôr špecifickú polypeptidovú štruktúru než proteíny všeobecne.

Polypeptidy RG1, ich fragmenty či iné deriváty, ich analógy alebo bunky, ktoré ich exprimujú, sa môžu využiť ako imunogény na produkciu protilátok proti nim (Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989). Týmto protilátkami môžu byť napr. polyklonálne či monoklonálne protilátky. Predkladaný vynález tiež zahŕňa chimérické a jednoreťazcové protilátky, humanizované a ľudské protilátky a ďalej fragmenty Fab alebo produkty expresných knižníc Fab. Na prípravu týchto fragmentov a protilátok je možné využiť množstvo spôsobov známych odborníkom.

Protilátky pripravené proti polypeptidom, ktoré zodpovedajú sekvencii uvedenej v predkladanom vynáleze, sa môžu získať priamou injekciou polypeptidov do živočíšneho jedinca alebo podaním polypeptidov živočíšnemu jedincovi, najlepšie iného druhu než človek. Takto získaná protilátka potom bude sama viazať tieto polypeptidy. Tak sa aj pomocou sekvencie, ktorá kóduje iba fragment týchto polypeptidov, dajú získať protilátky viažuce celý natívny polypeptid. Tieto protilátky je potom možné využiť na izoláciu polypeptidov z tkanív, ktoré exprimujú požadovaný polypeptid.

Pri príprave monoklonálnych protilátok sa môže využiť akýkoľvek spôsob, ktorý zaistí tvorbu protilátok kultúrami permanentných bunkových línií. Ako príklad je možné uviesť prípravu hybridómov (Kohler a Milstein, Nature 256: 495 - 497, 1975), prípravu hybridómov ľudských B buniek (Kozbor et al., Immunology Today č. 72, 1983) a prípravu EBV-hybridómov na produkciu ľudských monoklonálnych protilátok (Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer, Alan R. Liss, Inc., 77 - 96, 1985).

Je možné tiež využiť spôsoby vyvinuté na prípravu „chimérických protilátok“, založených na spojení myších génov pre protilátky s ľudskými génmi pre protilátky a získať tak molekulu so zodpovedajúcou špecifickou antigénnou špecifitou a biologickou aktivitou (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). Okrem toho je možné využiť aj spôsoby na prípravu jednoreťazcových protilátok (U.S. Pat. č. 4 946 778) a prispôbiť ich na prípravu jednoreťazcových protilátok, ktoré sú špecifické pre RG1.

Ďalej je možné pripraviť „ľudské“ („humánne“) protilátky spôsobmi opísanými v patentoch USA č. 5 877 397 a 5 569 825, ktoré sú uvedené v plnom znení formou odkazu.

Protilátky je tiež možné pripraviť indukovaním produkcie *in vivo* v populácii lymfocytov alebo plošným testovaním rekombinantných imunoglobulínových knižníc či súborov vysoko špecifických väzbových látok, ako je opísané v publikáciách Orlandi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833 - 3837, 1989) a Winter a Milstein (Nature 349: 293 - 299, 1991).

Je možné tiež pripraviť fragmenty protilátok, ktoré obsahujú špecifické väzbové miesta pre RG1. Tieto fragmenty zahŕňajú okrem iného napr. fragmenty F(ab')₂, ktoré sa môžu pripraviť pepsínovým štiepením molekuly protilátky a fragmenty Fab, ktoré je možné pripraviť redukciou disulfidických mostíkov fragmentov F(ab')₂. Je možné tiež pripraviť expresné knižnice Fab na rýchlu a ľahkú identifikáciu fragmentov monoklonálnych Fab s požadovanou špecifitou (Huse et al., Science 256: 1270 - 1281, 1989).

Aminokyselinová sekvencia RG1 uvedená v tomto vynáleze môže slúžiť na selekciu špecifických oblastí polypeptidov RG1 na prípravu protilátok. Odborníkom je známe, že výber oblastí alebo epitopov polypeptidov RG1, proti ktorým je protilátka zameraná, sa môže líšiť podľa zamýšľaného využitia. Napr. protilátky určené na imunologické testovanie RG1 viazaného na membránu buniek prostaty by mali byť zamerané proti prístupným epitopom na polypeptide RG1. Oblasti polypeptidu RG1 majú imunogénnu štruktúru a ďalšie oblasti a domény je možné ľahko identifikovať pomocou množstva ďalších spôsobov známych odborníkom, ako napr. analýza podľa Chou-Fasmana, Garnier-Robsona či Jameson-Wolfa. Fragmenty obsahujúce tieto aminokyselinové zvyšky sú zvlášť výhodné na prípravu protilátok proti RG1. Medzi zvlášť výhodné fragmenty patrí okrem iného sekvencia PLGGESICSAGAPAKYSIT (sekvencia SEQ ID NO: 8); HSSDYSM-WRKNQYVS (sekvencia SEQ ID NO: 10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (sekvencia SEQ ID NO: 11); a NEIVSASVPET (sekvencia SEQ ID NO: 12).

Príprava protilátok proti týmto oblastiam je opísaná v príklade 4.

Protilátky proti RG1 opísané v predkladanom vynáleze môžu byť zvlášť výhodné na diagnostické testovanie, zobrazovacie spôsoby a terapeutické spôsoby pri liečbe rakoviny prostaty. Tento vynález navrhuje rad imunologických testov na detekciu polypeptidov RG1 a na diagnostiku rakoviny prostaty. Tieto testy obvykle zahŕňajú jednu alebo viac protilátok proti RG1 schopnú rozpoznávať a viazať polypeptid RG1. Najvýhodnejšími protilátkami sú tie protilátky, ktoré viažu RG1 a neviažu (alebo viažu len slabo) iné polypeptidy než RG1. Tieto testy zahŕňajú rôzne formy imunologických testov dobre známe odborníkom, vrátane okrem iného rôznych typov rádioimunologických testov, testov ELISA a pod. Okrem toho predkladaný vynález tiež uvádza imunologické zobrazovacie spôsoby na detekciu rakoviny prostaty, vrátane okrem iného radioscintigrafických zobrazovacích spôsobov pomocou značených protilátok proti RG1. Tieto testy sa môžu využiť klinicky na detekciu, sledovanie a určenie prognózy rakoviny prostaty.

Opísané protilátky môžu slúžiť na izoláciu a identifikáciu klonov exprimujúcich polypeptid uvedený v predkladanom vynáleze alebo na purifikáciu tohto polypeptidu ukotvením protilátky na pevný nosič na izoláciu a/alebo purifikáciu afinitnou chromatografiou.

Protilátky proti RG1 sa môžu ďalej použiť na izoláciu buniek pozitívnych na RG1 použitím techník založených na triedení buniek a purifikačnými technikami. Protilátky proti RG1 sa môžu využiť zvlášť na izoláciu nádorových buniek prostaty z nádorového tkaniva xenograftov alebo z buniek tkanivových kultúr a pod. triedením buniek protilátkami alebo technikami afinitnej purifikácie. Ďalej je možné protilátky proti RG1 uvedené v tomto vynáleze využiť na prípravu antiidiotypových protilátok napodobňujúcich polypeptid RG1.

Protilátky proti RG1 môžu slúžiť na detekciu výskytu rakoviny prostaty či nádorových metastáz. Prítomnosť týchto buniek obsahujúcich RG1 v rôznych biologických vzorkách, ako je sérum, vzorky biopsií prostaty a iného tkaniva, je možné stanoviť pomocou protilátok proti RG1. Protilátky proti RG1 je tiež možné využiť na rôzne zobrazovacie spôsoby ako imunoscintigrafia pomocou ^{99m}Tc (či iného izotopu) konjugovaného s protilátkou. Napr. zobrazovací protokol podobný protokolu nedávno opísanému v literatúre, ktorý využíva ^{111}I konjugovaný s protilátkou proti PSMA, je možné využiť na detekciu opakovaných a metastatických nádorov prostaty (Sodee et al., Clin. Nuc. Med. 21: 759 - 766, 1997).

Protilátky proti RG1 uvedené v predkladanom vynáleze sa môžu značiť markerom schopným detekcie alebo konjugovať s ďalšou molekulou, ako napr. s cytotoxickou látkou a využiť na zacielenie tejto ďalšej molekuly proti bunke pozitívnej na RG1 (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). Príklady cytotoxických látok zahŕňajú okrem iného ricín, doxorubicín, daunorubicín, taxol, etidum-bromid, mitomycín, etoposide, tenoposide, vinkristín, vinblastín, kolchicín, dihydroxyantracindión, aktinomycín D, difterický toxín, *Pseudomonas* exotoxín (PE) A, PE40, abrin a glukokortikoidné a iné chemoterapeutické činidlá, ako aj rádioizotopy. Markery vhodné na detekciu sú okrem iného rádioizotopy, fluorescenčné zlúčeniny, bioluminiscenčné zlúčeniny, chemiluminiscenčné zlúčeniny, kovové chelátory či enzýmy. Medzi vhodné rádioizotopy patria nasledujúce izotopy: ^{124}Sb , ^{125}Sb , ^{74}As , ^{103}Ba , ^{140}Ba , ^7Be , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{109}Cd , ^{115m}Cd , ^{45}Ca , ^{139}Ce , ^{141}Ce , ^{144}Ce , ^{137}Cs , ^{51}Cr , ^{56}Co , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{64}Co , ^{169}Er , ^{152}Eu , ^{153}Gd , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{175}Hf , ^{181}Hf , ^{111}In , ^{123}I , ^{131}I , ^{192}Ir , ^{55}Fe , ^{59}Fe , ^{85}Kr , ^{210}Pb , ^{54}Mn , ^{197}Hg , ^{203}Hg , ^{99}Mo , ^{147}Nd , ^{237}Np , ^{63}Ni , ^{95}Nb , $^{185} + ^{191}\text{Os}$, ^{103}Pd , ^{195m}Pt , ^{143}Pr , ^{147}Pm , ^{233}Pa , ^{2226}Ra , ^{186}Re , ^{86}Rb , ^{103}Ru , ^{106}Ru , ^{44}Sc , ^{46}Sc , ^{75}Se , ^{110}mAg , ^{11}Ag , ^{22}Na , ^{85}Sr , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{35}S , ^{182}Ta , ^{99m}Tc , ^{125}Te , ^{132}Te , ^{170}Tl , ^{204}Tl , ^{228}Th , ^{232}Th , ^{113}Sn , ^{44}Ti , ^{185}W , ^{48}V , ^{49}V , ^{169}Yb , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{91}Y , ^{65}Zn , ^{95}Zr .

Imunoterapia rakoviny prostaty

Predkladaný vynález uvádza rôzne imunoterapeutické spôsoby liečby rakoviny prostaty, ako napr. terapia protilátkami, vakcínami *in vivo*, či imunoterapeutickými spôsobmi *ex vivo*. V jednom spôsobe uvádza tento vynález na liečbu rakoviny prostaty systémové využitie protilátok proti RG1. Napr. nekonjugované protilátky proti RG1 je možné do pacienta vnášať tak, že sa protilátka naviaže na RG1, ktorý sa nachádza na prostatických nádorových bunkách alebo v nich, prípadne, je na ne pripojený a sprostredkuje deštrukciu týchto buniek a tumoru mechanizmami, ako sú napr. cytolyza sprostredkovaná komplementom, bunková cytotoxicita závislá od protilátky, zmena fyziologickej funkcie RG1 a/alebo inhibícia väzby na ligand alebo dráh prenosu signálu. Protilátky proti RG1 konjugované s toxickými látkami, ako ricín či rádioizotopy, je možné tiež využiť terapeuticky na priame doručenie toxikkej látky do prostatických nádorových buniek, ktoré nesú RG1, čím dôjde k deštrukcii nádorových buniek.

Na imunoterapiu rakoviny prostaty pomocou protilátok proti RG1 je možné využiť rad prevzatých spôsobov, ktoré sa využívajú v súvislosti s inými typmi rakoviny, okrem iného napr. s rakovinou hrubého čreva (Arlen et al., Crit. Rev. Immunol. 18: 133 - 138, 1998), mnohonásobným myelómom (Ozaki et al., Blood 90: 3179 - 3186, 1997; Tsunenari et al., Blood 90: 2437 - 2444, 1997), rakovinou žalúdka (Kasprzyk et al., Cancer Res. 52: 2771 - 2776, 1992), B-bunkovým lymfómom (Funakoshi et al., Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93 - 101, 1996), leukémiou (Zhong et al., Leuk. Res. 20: 581 - 589, 1996), kolorektálnou rako-

vinou (Moun et al., Cancer Res. 54: 6160 - 6166, 1994; Velders et al., Cancer Res. 55: 4398 - 4403, 1995) a rakovinou prsníka (Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11: 117 - 127, 1991).

Predkladaný vynález ďalej poskytuje vakcíny navrhnuté tak, aby obsahovali polypeptid RG1 alebo jeho fragmenty. Využitie nádorovo špecifického antigénu na prípravu vakcín na vyvolanie humorálnej a bunkovej imunity pri liečbe rakoviny je veľmi dobre známy spôsob v stave techniky a využíva sa na liečbu rakoviny prostaty pomocou ľudských imunogénov PSMA a imunogénov PAP hlodavcov (Hodge et al., Int. J. Cancer 63: 231 - 237, 1995; Fong et al., J. Immunol. 159: 3113 - 3117, 1997). Tieto spôsoby je ľahké uskutočňovať využitím polypeptidu RG1 alebo jeho fragmentu, alebo molekuly nukleovej kyseliny kódujúcej RG1 a rekombinantných vektorov schopných exprimovať a správne prezentovať imunogén RG1.

Na doručenie molekuly nukleovej kyseliny kódujúcej RG1 sa môžu využiť napr. doručovacie systémy založené na vírusových génoch. Rôzne doručovacie systémy založené na vírusových génoch, ktoré sa môžu využiť v tomto aspekte vynálezu, zahŕňajú, ale bez obmedzenia, vírus kravských kiahní, vírus kiahní hydiny, kiahní kanárikov, adenovírusy, vírus chrípky, vírus obrny, vírus asociovaný s adenovírusom, letivírusy alebo vírus sindbus (Restifo, in Curr. Opin. Immunol. 8: 658 - 663, 1996). Je tiež možné využiť nevírusové systémy využívajúce vnesenie holej molekuly DNA, ktorá kóduje polypeptid RG1 alebo jeho fragment do pacientovho organizmu (napr. intramuskulárne) s cieľom vyvolať protinádorovú odpoveď. V jednom uskutočnení tohto vynálezu je možné využiť úplnú cDNA ľudského *rgl*. V inom uskutočnení je možné využiť fragmenty cDNA *rgl*. V ďalšom uskutočnení je možné využiť molekulu nukleovej kyseliny *rgl*, ktorá kóduje špecifické epitopy T lymfocytov (CTL). Epitopy CTL je možné určiť pomocou špecifických algoritmov (napr. Epimer, Brown University) na identifikáciu peptidov vnútri polypeptidu RG1, ktoré sú schopné optimálnej väzby na špecifické alely HLA.

Je možné tiež využiť rôzne stratégie *ex vivo*. Jeden spôsob zahŕňa využitie dendritických buniek, ktoré prezentujú polypeptid RG1 pacientovmu imunitnému systému ako antigén. Dendritické bunky exprimujú molekuly MHC I a II, kostimulačnú molekulu B7 a IL-12 a sú teda vysoko špecializované na prezentáciu antigénu. Pri rakovine prostaty sa využívajú v klinických skúškach 1. stupňa autológne dendritické bunky pulzované (pulsed) s peptidmi membránového antigénu špecifického pre prostatické bunky (PSMA) na stimuláciu imunitného systému pacientov s rakovinou prostaty (Tjoa et al., Prostate 28: 65 - 69, 1996; Murphy et al., Prostate 29: 371 - 380, 1996). Dendritické bunky môžu slúžiť na prezentáciu polypeptidov RG1 T bunkám v kontexte molekúl MHC I a II. V jednom uskutočnení tohto vynálezu sú dendritické bunky pulzované s polypeptidmi RG1 schopnými viazať molekuly MHC. V inom uskutočnení sú dendritické bunky pulzované s úplným polypeptidom RG1. Ďalšie uskutočnenie zahŕňa navodenie zvýšenej expresie génu *rgl* v dendritických bunkách pomocou rôznych vektorov známych v stave techniky, ako sú adenovírus (Arthur et al., Cancer Gene Ther. 4: 17 - 25, 1997), retrovírus (Henderson et al., Cancer Res. 56: 3763 - 3770, 1996), lentivírus, adenoasociovaný vírus, transfekcie DNA (Ribas et al., Cancer Res. 57: 2865 - 2869, 1997) a transfekcie nádorovo odvodennej RNA (Ashley et al., J. Exp. Med. 186: 1177 - 1182, 1997).

Antiidiotypové protilátky proti RG1 je možné tiež využiť pri protinádorovej terapii ako vakcínu na vyvolanie imunitnej odpovede proti bunkám exprimujúcim polypeptid RG1. Zvlášť príprava antiidiotypových protilátok je odborníkom dobre známa a tento spôsob je ľahké prispôbiť na prípravu antiidiotypových protilátok anti-RG1, ktoré napodobňujú epitop na polypeptide RG1 (pozri napr. 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). Takúto antiidiotypovú protilátku je potom možné využiť pri antiidiotypovej liečbe, podobne ako iné protilátky zamerané proti nádorovým antigénom.

Na vyvolanie profylaktickej a terapeutickkej humoralnej a bunkovej imunitnej odpovede proti nádorovým bunkám exprimujúcim RG1 je možné využiť spôsoby génovej imunizácie. Využitím opísaných molekúl DNA, ktoré kódujú RG1, je možné konštrukty obsahujúce DNA, ktorá kóduje polypeptid/imunogén RG1 so zodpovedajúcimi regulačnými sekvenciami, priamo injikovať do svalu alebo kože jedinca, takže svalové alebo kožné bunky konštrukt prijímú a exprimujú kódovaný polypeptid/imunogén RG1. Polypeptid/imunogén RG1 sa môže exprimovať ako povrchový polypeptid alebo môže byť sekretovaný. Expresia polypeptidu/imunogénu RG1 vedie k vyvolaniu profylaktickej alebo liečebnej humoralnej a bunkovej imunity proti rakovine prostaty. Je možné využiť množstvo profylaktických a liečebných spôsobov génovej imunizácie známych v stave techniky (pozri prehľad informácií a prác publikovaných na internetovej adrese www.genweb.com).

„Antisense“ oligonukleotidy, „antisense“ vektory a ribozýmy

„Antisense“ polynukleotidy komplementárne k *rgl* je možné pripraviť synteticky. Tieto oligonukleotidy je možné doručiť do buniek samotné alebo s lipidmi, ktoré napomáhajú prijatiu „antisense“ oligonukleotidov bunkami.

Alebo expresné vektory, vektory odvodené od retrovírusov, adenovírusu, herpesvírusov herpes alebo kravských kiahní alebo z rôznych bakteriálnych plazmidov môžu tiež slúžiť na konštrukciu a doručenie rekombinantných vektorov, ktoré budú exprimovať „antisense“ *rgl* (pozri napr. spôsoby opísané v publikáciách Sambrook et al. alebo Ausubel et al.).

Polynukleotidy obsahujúce úplnú sekvenciu cDNA a/alebo jej regulačné elementy umožňujú pracovníkom vo výskume, aby využívali polynukleotidy *rgl* ako nástroj na prehľadávanie „sense“ vlákien (Yousoufian and Lodish, Mol. Cell. Biol. 13: 98 - 104, 1993) alebo „antisense“ vlákien (Eguchi et al., Annu Rev. Biochem. 60: 631 - 652, 1991) na zistenie regulácie funkcií tohto génu. Tieto spôsoby sú už v stave techniky dobre známe, a „sense“ alebo „antisense“ oligoméry alebo väčšie fragmenty je možné odvodiť z rôznych miest z kódujúcich alebo nekódujúcich oblastí.

Gény kódujúce RG1 môžu byť vypnuté transfekciou buniek alebo tkaniva expresnými vektormi, ktoré exprimujú vysokú hladinu požadovaného fragmentu polynukleotidu *rgl*. Tieto konštrukty môžu zaplaviť bunku netranslatovateľnými „sense“ či „antisense“ sekvenciami. Aj keď nedôjde k integrácii do DNA, tieto vektory môžu ďalej transkribovať molekuly RNA, pokiaľ nie sú všetky kópie vyradené endogénnymi nukleázami. Pri nereplikatívnych vektoroch môže prechodná expresia trvať mesiac alebo viac a pokiaľ sú súčasťou vektorového systému zodpovedajúce replikačné elementy, môže trvať aj dlhšie.

Ako bolo uvedené, zmeny génovej expzie je možné dosiahnuť pomocou „antisense“ molekúl DNA či RNA, ktoré kontrolujú oblasti *vrgl*, napr. promótor, enhancer a intróny. Výhodné sú oligonukleotidy odvozené z miesta iniciácie transkripcie, t. j. z oblasti medzi -10 a +10 vedúcej „leader“ sekvencie. Je tiež možné pripraviť „antisense“ molekuly na blokovanie translácie mRNA zabránením väzby transkriptu na ribozóm. Inhibíciu je tiež možné uskutočniť pomocou spôsobu využívajúceho párovanie báz do „trojitej závitnice“. Tvorbou trojitej závitnice dochádza k zamedzeniu schopnosti molekuly dostatočne sa otvoriť pre väzbu s polymerázami, transkripčnými faktormi alebo regulačnými molekulami, ktorú by inak ako dvojité závitnice mala. Najnovšie liečebné zlepšenia, ktoré využívajú tvorbu trojitých závitníc DNA (triplex DNA), sú zhrnuté v publikácii Gee J. E. et al. (In Huber a Car, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994).

Ribozýmy sú enzymatické molekuly RNA, ktoré sú schopné katalyzovať špecifické štiepenie RNA (patent USA č. 4 987 071; WO93/23057). Mechanizmus pôsobenia ribozýmu spočíva v sekvencne špecifickej hybridizácii molekuly ribozýmu s komplementárnou cieľovou RNA, nasledovanej endonukleolytickým štiepením. V predkladanom vynáleze sú pripravené ribozýmové molekuly s tzv. „hammerhead“ motívom, ktoré môžu špecificky a účinne katalyzovať endonukleolytické štiepenie RNA, ktorá kóduje RG1. Špecifické štiepne miesta pre ribozýmy je možné na každej potenciálnej cieľovej RNA predbežne identifikovať vyhľadávaním štiepných miest pre ribozýmy, ktoré obsahujú sekvencie GUA, GUU a GUC na cieľovej molekule. Hneď ako sa tieto miesta identifikujú, je možné určiť tie charakteristiky sekundárnej štruktúry krátkych sekvencií RNA s 15 - 20 ribonukleotidmi, ktoré zodpovedajú oblasti cieľového génu obsahujúcej štiepne miesto, a na základe ktorých by bolo možné daný oligonukleotid vyradiť z funkcie. Vhodnosť potenciálnych cieľov je tiež možné zhodnotiť testovaním prístupnosti pre hybridizáciu s komplementárnymi oligonukleotidmi pomocou ribonukleázových ochranných testov (ribonuclease protection assays) (Irie et al., Advances Pharmacol. 40: 207 - 257, 1997).

„Antisense“ molekuly a ribozýmy uvedené v tomto vynáleze je možné pripraviť akýmkoľvek spôsobom na syntézu molekúl RNA známym v stave techniky. Sú to napr. spôsoby chemickej syntézy oligonukleotidov, ako syntéza použitím fosforamiditu v pevnej fáze. Molekuly RNA je možné pripraviť transkripciou *in vitro* a *in vivo* alebo pomocou sekvencií DNA, ktoré kódujú RG1. Tieto sekvencie DNA sa môžu viesť do celého radu vektorov so zodpovedajúcimi promótormi RNA polymerázy ako T7 alebo SP6. Je možné tiež viesť konštrukty „antisense“ cDNA, ktoré syntetizujú „antisense“ RNA, do bunkových línií, buniek alebo tkanív.

Molekuly RNA môžu byť modifikované s cieľom zvýšiť ich stabilitu vnútri bunky alebo ich polčas. Možnými zmenami sú okrem iného napr. pripojenie príľahlých sekvencií na 5' koniec a/alebo 3' koniec molekúl, alebo využitie fosforotioátových alebo 2'O-metylových väzieb namiesto fosfodiesterových pri tvorbe základnej kostry molekuly. Stabilitu molekúl je možné tiež zvýšiť vložením neobvyklých báz, ako sú inozín alebo queozín (queosine), ako aj acetyl-, metyl-, tio- a podobne modifikovaných foriem adenínu, guanínu, tymínu a uridínu, ktoré nie sú tak ľahko rozpoznávané endogénnymi endonukleázami.

Medzi spôsoby vnesenia „antisense“ vektorov do buniek alebo tkanív patria opísané spôsoby, ktoré sú vhodné tak na liečenie *in vivo*, ako aj *in vitro* a *ex vivo*. Na liečenie *ex vivo* sú vektory vnášané do buniek odobratých z pacientovho organizmu a klonálne pomnožené na autológnu transplantáciu do toho istého pacienta, ako je uvedené v patentoch USA č. 5 399 493 a 5 437 994, ktoré sú uvedené v literatúre. Prenos transfekciou alebo lipozómami či inými lipidickými a nelipidickými činidlami je odborníkom tiež dobre známy.

Testy na identifikáciu látok viažucich RG1

Predkladaný vynález sa tiež týka testov a spôsobov, ktoré môžu slúžiť na identifikáciu látok (agensov, činidiel) viažucich RG1. Tieto látky viažuce RG1 môžu byť identifikované najmä na základe schopnosti ligandu RG1 alebo inej látky a zložky viazať RG1 a/alebo schopnosti inhibovať/stimulovať aktivitu RG1.

Látky viažuce polypeptid RG1 môžu byť tiež identifikované pomocou kvasinkového dvojhybridného systému a testu väzbovej schopnosti. Pri kvasinkovom dvojhybridnom systéme sa expresná jednotka, ktorá kó-

duje fúzny proteín skladajúci sa z transkripčného faktora s jednou podjednotkou, transkripčného faktora s dvomi podjednotkami a polypeptidu RG1 vnesie do bunky kvasinky a je v nej exprimovaná. Táto bunka je ďalej pozmenená tak, aby obsahovala (1) expresnú jednotku kódujúcu detegovateľný marker, na ktorého expresiu je potrebný transkripčný faktor s dvomi podjednotkami a (2) expresnú jednotku kódujúcu fúzny proteín skladajúci sa z druhej podjednotky transkripčného faktora a klonovaného segmentu DNA. Pokiaľ klonovaný segment DNA kóduje proteín viažuci polypeptid RG1, výsledkom expresie je interakcia RG1 a kódo-

vaného proteínu. Tým sa obe podjednotky a transkripčný faktor dostanú do väzbovej blízkosti a transkripčný faktor sa môže obnoviť. Tak je exprimovaný detegovateľný marker. Kvasinkový dvojhybridný systém je zvlášť výhodný pri plošnom testovaní knižnice cDNA, ktorá kóduje segmenty bunkových väzbových partnerov RG1.

Medzi polypeptidy RG1, ktoré je možné využiť v opísaných testoch, patrí okrem iného napr. izolovaný polypeptid RG1, fragment polypeptidu RG1, či bunka, ktorá bola pozmenená tak, aby exprimovala polypeptid RG1. Polypeptidom RG1 môže byť ďalej celý tento polypeptid či jeho definovaný fragment. Bežnému odborníkovi bude zrejmé, že pokiaľ je polypeptid RG1 testovateľný na väzbu k nejakej látke, napr. pomocou posunu molekulovej váhy alebo aktivity, je možné tento spôsob testovania využiť.

Spôsob, ktorým bude určené, či látka/bunková zložka viaže polypeptid RG1, bude primárne závisieť od charakteru použitého polypeptidu RG1. Na určenie, či látka viaže RG1 alebo jeho fragment, môže slúžiť napr. gélový retardačný test. Na testovanie polypeptidu RG1 je tiež možné využiť imunodetekciu alebo spôsoby založené na biočipoch. Na zistenie, či určitá látka viaže RG1, môže skúsený odborník využiť rad spôsobov známych zo stavu techniky.

Látky a bunkové zložky je možné ďalej testovať, či sú schopné ovplyvňovať aktivitu polypeptidu RG1, pomocou bezbunkového testovacieho systému alebo bunkového testovacieho systému. Definované aktivity polypeptidu RG1 môžu byť ďalej testované funkčnými testami.

V kontexte predkladaného vynálezu platí, že látka antagonizuje aktivitu RG1, pokiaľ jeho aktivitu znižuje. Výhodný antagonista selektívne antagonizuje RG1 a neovplyvňuje ďalšie bunkové proteíny. Výhodný antagonista ďalej znižuje aktivitu RG1 o viac než 50 %, výhodnejšie o viac než 90 % a najvýhodnejšie vyradí celkovú aktivitu RG1.

Látky testované uvedeným spôsobom sa môžu vybrať náhodne alebo racionálne. V kontexte predkladaného vynálezu platí, že látka sa vyberá náhodne, pokiaľ sa neprihliada na špecifické sekvencie polypeptidu RG1. Prikladom náhodne vybraných látok je využitie chemickej knižnice alebo kombinatorickej knižnice peptidov, živnej pôdy pre určitý organizmus alebo rastlinného extraktu.

V kontexte predkladaného vynálezu platí, že látka je vybraná racionálne, pokiaľ je vybraná nenáhodne v závislosti od sekvencie cieľového miesta a/alebo jeho konformácie a v súvislosti s pôsobením danej látky. Látky sa môžu vyberať alebo navrhovať racionálne na základe peptidových sekvencií polypeptidu RG1.

Racionálne vybratou peptidovou látkou môže byť napr. peptid, ktorého aminokyselinová sekvencia je zhodná s fragmentom polypeptidu RG1.

Látky testované spôsobmi podľa predkladaného vynálezu môžu byť napr. peptidy, protilátky, oligonukleotidy, malé molekuly a deriváty vitamínov a tiež uhľovodíky. Skúsenému odborníkovi je zrejmé, že výber látok pre uvedený testovací spôsob nie je nijako obmedzený ich štruktúrnou povahou. Jedna trieda látok podľa predkladaného vynálezu sú peptidové látky, ktorých aminokyselinové sekvencie sú vybrané na základe aminokyselinovej sekvencie polypeptidu RG1.

Peptidové látky je možné pripraviť pomocou štandardných syntetických spôsobov, ktoré využívajú látky v pevnej (alebo kvapalnej) fáze, ktoré sú v stave techniky známe. Navyše je možné syntetizovať DNA, ktorá kóduje tieto peptidy pomocou komerčne dostupných prístrojov na syntézu oligonukleotidov a pripraviť ich rekombinantne pomocou štandardných rekombinantných produkčných systémov. Prípravu pomocou syntézy v pevnej fáze je nutné využiť tam, kde sa vyskytujú aminokyseliny nekódované žiadnym génom.

Inými látkami uvedenými v predkladanom vynáleze sú protilátky imunoreaktívne s kritickými miestami polypeptidu RG1. Ako je tu už opísané, protilátky sa získavajú imunizáciou vhodných cicavčích organizmov peptidmi, ktoré obsahujú ako antigénnu oblasť tie časti polypeptidu RG1, proti ktorým majú byť protilátky zamerané. Tieto látky je možné využiť pri štúdiách väzbových kompetícií na identifikáciu inhibičných látok druhej generácie a na blokovanie aktivity RG1.

Bunkové extrakty testované spôsobmi uvedenými v predkladanom vynáleze môžu byť napr. vodné extrakty buniek či tkanív, organické extrakty buniek alebo tkanív alebo čiastočne purifikované frakcie buniek. Skúsenému odborníkovi je zrejmé, že výber zdroja bunkového extraktu pre uvedený testovací spôsob nie je nijako obmedzený jeho štruktúrnou povahou.

Látky viažuce polypeptid RG1, ako napr. protilátka proti RG1, sa môžu využiť na modulovanie aktivity RG1, na zacielenie protirakovinových látok do zodpovedajúcich cicavčích buniek alebo na identifikáciu látok blokujúcich interakciu s RG1. Bunky exprimujúce RG1 je možné zacieliť alebo identifikovať použitím látky, ktorá viaže RG1.

To, ako bude látka viažuca RG1 využitá, závisí od jej povahy. Látka viažuca RG1 môže byť napr. využitá na: doručenie konjugovaných toxínov, ako sú difterický toxín, toxín cholery, ricín alebo exotoxín *Pseudomonas*, do bunky exprimujúcej RG1; moduláciu aktivity RG1; priame zabitie bunky exprimujúcej RG1; alebo pri skriningoch na identifikáciu látok s kompetitívnou väzbou. Tak napr. látka inhibujúca RG1 sa môže využiť na priamu inhibíciu rastu buniek, ktoré exprimujú RG1, zatiaľ čo látka viažuca RG1 sa môže využiť ako diagnostické činidlo.

Farmaceutické prípravky a spôsoby podávania

Predkladaný vynález sa tiež týka využitia farmaceutických kompozícií, ktoré obsahujú polynukleotidy *rgl*, polypeptidy RG1, protilátky proti nim, ich agonisty, antagonisty alebo inhibítory a to samotné alebo v kombinácii aspoň s jednou látkou, ako napr. stabilizačnou látkou a ktoré môžu byť podané v akomkoľvek sterilnom, biokompatibilnom farmaceutickom nosiči, ako okrem iného napr. vo fyziologickom roztoku, dextróze alebo vode. Ktorúkoľvek z týchto molekúl je možné pacientovi podať samotnú alebo v kombinácii s inými látkami, liečivami či hormónmi vo farmaceutických kompozíciách, kde sú zmiešané s vehikulom (vehikulmi) alebo s farmaceuticky prijateľnými nosičmi. V jednom uskutočnení tohto vynálezu je farmaceutický prijateľný nosič farmaceuticky inertný.

Predkladaný vynález sa tiež týka spôsobu podania farmaceutických kompozícií. Toto podanie sa môže uskutočňovať perorálne alebo parenterálne. Medzi spôsoby parenterálneho podania patrí podanie topické, intraarteriálne (priamo do tumoru), intramuskulárne, subkutánne, intramedulárne, intratekálne, intraventrikulárne, intravenózne, intraperitoneálne alebo intranazálne. Okrem aktívnych zložiek môžu tieto farmaceutické kompozície obsahovať vhodné farmaceuticky prijateľné nosiče, ako sú vehikulá a pomocné látky, ktoré umožňujú spracovanie aktívnych zložiek na preparáty, ktoré je možné farmaceuticky využiť. Ďalšie podrobnosti o spôsoboch prípravy a podania týchto látok je možné nájsť v poslednom vydaní Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa).

Farmaceutické kompozície na perorálne podávanie je možné formulovať pomocou farmaceuticky prijateľných nosičov dobre známych zo stavu techniky v dávkach vhodných na orálne podanie. Tieto nosiče umožňujú formuláciu farmaceutických kompozícií ako tablety, pilulky, dražé, tobolky, roztoky, gély, sirupy, husté suspenzie, normálne suspenzie a pod., určené na podanie pacientom.

Farmaceutické prípravky na perorálne podávanie je možné získať kombináciou aktívnych zložiek s pevným vehikulom, podľa potreby rozomletím vzniknutej zmesi a po prípadnom pridaní vhodných aditív (pomocných látok) spracovaním tejto zmesi granúl na tablety alebo dražé. Vhodnými vehikulmi sú sacharidové alebo proteínové plnidlá ako cukry, napr. laktóza, sacharóza, manitol alebo sorbitol; kukuričný, pšeničný, ryžový alebo zemiakový škrob, alebo škrob z iných rastlín; celulóza vo forme metylcelulózy, hydroxypropylmetylcelulózy alebo karboxymetylcelulózy sodnej; gummy ako arabská guma alebo tragakantová guma; a ďalšie proteíny ako želatína a kolagén. Podľa potreby je možné pridať dekompozičné alebo solubilizačné činidlá ako napr. zosieťovaný polyvinylpyrrolidón, agar, kyselinu alginovú alebo jej soľ, ako napr. alginát sodný.

Jadrá dražé sa obaľujú do vhodných potáhov, ako sú napr. koncentrované cukrové roztoky, ktoré môžu tiež obsahovať arabskú gumu, mastenec, polyvinylpyrrolidón, karbopolový gél, polyetylén glykol a/alebo oxid titaničitý, roztoky lakov a vhodné organické rozpúšťadlá alebo ich zmesi. Do potáhov tabliet alebo dražé sa môžu pridať farbivá alebo pigmenty na identifikáciu výrobku či označenia množstva aktívnej látky, t. j. dávkovania.

Medzi farmaceutické prípravky, ktoré sa môžu používať perorálne, patria napr. „push-fit“ želatínové tobolky ako aj mäkké zatavené želatínové tobolky a povrchý film z glycerolu alebo sorbitolu. „Push-fit“ tobolky môžu obsahovať aktívne zložky zmiešané s plnidlom alebo spojivom, ako je laktóza alebo škroby, lubrikanty, ako je mastenec alebo stearát horčíka, prípadne stabilizátory. V mäkkých tobolkách môžu byť aktívne zložky rozpúšťané alebo suspendované vo vhodných tekutinách/kvapalinách, ako sú masťné oleje, kvapalný parafín, alebo kvapalný polyetylén glykol s alebo bez stabilizátorov.

Medzi farmaceutické formulácie na parenterálne podávanie patria vodné roztoky aktívnych zložiek. Farmaceutické kompozície podľa tohto vynálezu určené na injekciu môžu byť formulované vo vodných roztokoch, výhodne vo fyziologických kompatibilných pufroch, ako je Hankov roztok, Ringerov roztok alebo pufrovaný fyziologický roztok. Vodné injekčné suspenzie môžu obsahovať látky, ktoré zvyšujú viskozitu suspenzie, ako je karboxymetylcelulóza sodná, sorbitol alebo dextrans. Suspenzie aktívnych zložiek môžu byť tiež pripravené ako vhodné olejové suspenzie na injekciu. Vhodnými lipofilnými rozpúšťadlami alebo vehikulami sú masťné oleje, ako je sezamový olej, alebo syntetické estery masťných kyselín, ako je etyloléat alebo triglyceridy, alebo lipozomy. Suspenzie môžu tiež prípadne obsahovať vhodné stabilizátory alebo látky zvyšujúce rozpustnosť zlúčenín, takže je možné pripraviť vysoko koncentrované roztoky.

Na topické alebo nazálne podanie sa do formulácie pridávajú penetranty pre zodpovedajúcu bariéru, ktorou majú preniknúť. Tieto penetranty sú v stave techniky bežne známe.

Súpravy (Kity)

Predkladaný vynález sa ďalej týka farmaceutických balení a súprav (kitov) zahŕňajúcich jednu alebo viac nádob naplnených jednou alebo viacerými zložkami opísaných kompozícií uvedených v tomto vynáleze. K tejto nádobke (nádobkám) môže byť priložený leták vo forme predpísanej príslušným vládny úradom, v ktorého kompetencii je výroba, použitie alebo predaj farmaceutických či biologických výrobkov, kde je vyjadrený súhlas tohto úradu s výrobou, použitím alebo predajom daného výrobku na ľudské účely.

Výroba a skladovanie

Farmaceutické kompozície uvedené v predkladanom vynáleze je možné pripraviť spôsobmi známymi v stave techniky, t. j. konvenčným miešaním, rozpúšťaním, granulovaním, prípravou dražé, drvením, tvorbou emulzií, uzatváraním do kapsúl alebo iných produktov alebo lyofilizáciou. Tieto farmaceutické kompozície sa môžu získať vo forme solí mnohých kyselín ako okrem iného napr. kyseliny chlorovodíkovej, sírovej, octovej, mliečnej, šťaveľovej, jablčnej, jantárovej a pod. Soli sú často rozpustnejšie vo vodných alebo iných protonických rozpúšťadlách, ktoré sú ich zodpovedajúcou voľnou bázičnou formou. Inokedy môže byť výhodným prípravkom lyofilizovaný prášok v 1 mM - 50 mM histidíne, 0,1 % - 2 % sacharóze, 2 % - 7 % manitolu v rozmedzí pH 4,5 až 5,5, ktorý sa pred použitím zmieša s pufrom.

Potom, ako sú farmaceutické kompozície obsahujúce zlúčeninu podľa predkladaného vynálezu, formulované v prijateľnom nosiči, pripravené, môžu byť uložené do vhodnej nádoby a označené na liečenie indikovaných stavov. Pre podávanie RG1 toto označenie zahŕňa množstvo, frekvenciu a spôsob podávania.

Terapeuticky účinná dávka

Farmaceutické kompozície vhodné na použitie v predkladanom vynáleze zahŕňajú kompozície, v ktorých sú aktívne zložky obsiahnuté v účinnom množstve na docieľenie zamýšľaného účelu, t. j. liečby konkrétneho chorobného stavu charakterizovaného expresiou RG1. Určenie účinnej dávky je celkom v kompetencii odborníkov.

Pre každú zložku môže byť terapeuticky účinná dávka najprv stanovená testovaním v bunkovej kultúre, napr. v neoplastických bunkách alebo na zvieracom modeli, obvykle na myšiach, králikoch, psoch alebo prasatách. Zvieracie modely sa tiež využívajú na určenie požadovaného koncentračného rozpätia a spôsobu podania. Na základe tejto informácie je potom možné stanoviť užitočné dávky a cesty podania ľudským jedincom.

Terapeuticky účinná dávka znamená také množstvo proteínu alebo jeho protilátok, jeho antagonistov alebo inhibítorov, ktoré zlepši symptómy alebo stav pacienta. Terapeutická účinnosť alebo toxicita týchto látok sa môže určiť štandardnými farmaceutickými spôsobmi v bunkovej kultúre alebo na zvieracom modeli; napr. ako ED_{50} (terapeuticky účinná dávka v 50 % populácie) a LD_{50} (dávka letálna pre 50 % populácie). Pomer dávok s terapeutickým a toxickým účinkom sa nazýva terapeutický index a dá sa vyjadriť ako pomer ED_{50}/LD_{50} . Výhodné sú farmaceutické kompozície majúce vysoké terapeutické indexy. Údaje získané testovaním bunkových kultúr a zvieracích modelov je možné využiť na určenie rozpätia pre dávkovanie ľudským jedincom. Dávkovanie týchto látok sa výhodne pohybuje v rozmedzí obehových koncentrácií, pri ktorých má ED_{50} nízku alebo žiadnu toxicitu. Dávkovanie sa pohybuje v tomto rozmedzí v závislosti od formy podania, citlivosti pacienta a cesty podania.

Presné dávkovanie určí lekár podľa toho, ktorému pacientovi má byť liek podaný. Dávkovanie a spôsob podania sa upravujú tak, aby sa dosiahla dostatočne vysoká hladina aktívnej zložky na docieľenie požadovaného účinku. Ďalšími faktormi, ktoré sa môžu brať do úvahy, sú napr. závažnosť chorobného stavu, ako napr. veľkosť nádoru a jeho umiestnenie; vek, hmotnosť a pohlavie pacienta; diéta, čas a početnosť podaní, kombinácia liečiv, citlivosť reakcie a ďalej tolerancia/odpoveď na liečbu. Farmaceutické kompozície s dlhodobou účinnosťou sa môžu podávať každé 3 - 4 dni, každý týždeň, raz každých 14 dní v závislosti od polčasu a rýchlosti klrens konkrétnej formulácie z organizmu.

Množstvá normálnej dávky sa môžu pohybovať od 0,1 do 100 000 mikrogramov, až do celkovej dávky 1 g, v závislosti od cesty podania. Návod na určité dávky a spôsoby podania je opísaný v literatúre, (pozri patenty USA 4 657 760; 5 206 344; alebo 5 225 212). Odborníci využijú odlišné formulácie pre polynukleotidy ako pre proteíny alebo ich inhibítory. Podobne bude podanie polynukleotidov či polypeptidov špecificky zodpovedať určitým bunkám, stavom, umiestneniam a pod.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1: Polynukleotidová sekvencia *rgl* (sekvencia SEQ ID NO: 1), kódujúca biologicky alebo imunologicky aktívnu formu RG1.

Obr. 2: Odvodená aminokyselinová sekvencia RG1 (sekvencia SEQ ID. NO: 2), kde domény F-spondínu sú podčiarknuté jednoducho a doména trombospondínu dvojito.

Obr. 3: Lineárne porovnanie sekvencie RG1 so sekvenciou potkanieho Mindinu. Sekvencia RG1 sa nachádza hore.

Obr. 4: Polynukleotidová a dedukovaná aminokyselinová sekvencia RG1.

Obr. 5: Expresia *rgl* v ľudských tkanivách zistená PCR analýzou založenou na Taqman. RNA z ľudských tkanív, tak nádorových ako normálnych, sa izolovala štandardnými spôsobmi. Priméry a sondy na detekciu expresie *rgl* mRNA boli navrhnuté pomocou Software Perkin Elmer's Primer Express a syntetizované pomocou Synthetic Genetics. *Rgl* mRNA sa stanovila v ľudskom prostatickom tkanive. Omnoho nižšiu expresiu *rgl* mRNA bolo možné zachytiť v ďalších tkanivách, napr. v pečeni.

Obr. 6: Purifikácia natívneho proteínu RG1 sekretovaného bunkami LNCaP. Analýza spôsobom Western blot pomocou antiséra pripraveného proti syntetickej peptidovej sekvencii RG1 (3C, sekvencia SEQ ID NO: 10, pozri príklad 4) na detekciu natívneho proteínu RG1 sekretovaného bunkami LNCaP. Frakcia eluovanej chromatografie na Q-Sepharóze z koncentrovaného média upraveného pre bunky LNCaP: (L) náplň kolóny, (F) prietok kolóny, (1-12) frakcie eluované cez soľný gradient. Predpokladaná molekulová hmotnosť RG1 je približne 36 kD, ale zistilo sa, že proteíny RG1 exprimované baktériami, bunkami BHK a LNCaP, všetky putujú na géli PAGE v pozícii približne 45 kD (L, frakcia 6-9).

Obr. 7: Imunohistochemické farbenie expresie RG1 v ľudskom prostatickom tkanive. Vzorky prostatického tkaniva sa získali na Urologickom oddelení lekárskej fakulty Stanfordovej univerzity. Farbenie sa uskutočnilo pomocou súpravy Vector ABC-AP (AK5002). Farbenie sa zviditeľnilo pomocou súpravy Vector Red substrate a následným farbením hematoxylínom. Výsledky ukazujú silné zafarbenie perilumenálnej membrány vo formáciách žľazy.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Predkladaný vynález je ďalej opísaný nasledujúcimi príkladmi. Tieto príklady sú uvedené iba na ilustráciu tohto vynálezu ako príklady špecifických uskutočnení. Tieto príklady síce ilustrujú určité špecifické aspekty predkladaného vynálezu, ale vynález inak neobmedzuje a nevymedzuje rozsah tohto vynálezu.

Všetky príklady sa uskutočnili štandardnými spôsobmi, ktoré sú odborníkom dobre známe a sú inými rutinne využívané, s výnimkou inak podrobne opísaných prípadov. Rutinné spôsoby molekulárnej biológie použité v uvedených príkladoch je možné uskutočňovať podľa štandardných laboratórnych príručiek, ako napr. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

Príklad 1

Identifikácia polynukleotidu ľudského *rgl*

Rgl bol identifikovaný ako gén exprimovaný v prostate prehľadávaním databázy Incyte LifeSeq. Táto nukleotidová sekvencia sa identifikovala prehľadávaním anotácií v databáze pomocou nástroja „Funkcia proteínu“ poskytnutého spoločnosťou Incyte na účely prehľadávania databázy. Táto nukleotidová sekvencia sa našla v anotovanej databáze v kategórii bunkových adhézných molekúl a bola opísaná ako homológ F-spondínu. Elektronická Northern analýza distribúcie polynukleotidových sekvencií *rgl* v súbore knižníc v databáze odhalila, že v knižniciach prostatických tkanív bol *rgl* exprimovaný vo vysokých hladinách a v nižších hladinách v knižniciach mnohých iných tkanív, vrátane normálnych a nádorových.

Po zostavení súboru klonov *rgl* z databázy do sústavy kontingov polynukleotidových sekvencií a po ich úprave na súvislú sekvenciu bola identifikovaná úplná kódujúca sekvencia umelo odvodeného zostaveného polynukleotidu. Táto sekvencia kóduje proteín homológny so spondínom-F a Mindinom-2.

Klony databázy Incyte 1640796, 1712252 a 1880265 sa získali z Incyte na experimentálne účely a klon 3360733 sa identifikoval ako obsahujúci najväčšiu časť nukleotidovej sekvencie 5' konca. Získala sa úplná sekvencia tohto klonu, ktorá obsahuje úplnú kódujúcu sekvenciu pre umelo odvodený proteín RG1. Táto sekvencia je uvedená na obr. 1 (sekvencia SEQ ID NO: 1).

Príklad 2

Expresia *rgl* mRNA

Expresia *rgl* mRNA v rôznych vzorkách normálneho a nádorového tkaniva a v bunkových líniiach sa určila semikvantitatívnou PCR pomocou testu Taqman (Perkin-Elmer). Vzorky normálnych, benígnych a malígnych prostatických tkanív, ktorých štádium (grading) sa určilo podľa Gleasonovho systému, sa získali z Urologickej katedry lekárskej fakulty Stanfordovej Univerzity. Štandardnými spôsobmi sa z nich izolovala RNA. RNA iných nádorových a normálnych tkanív sa získala z komerčných zdrojov, vrátane firiem Biotech a Biochain. Prostatické nádorové bunkové línie (PC-3, LNCaP a DU145) sa získali z American Type Culture Collection a kultivovali sa štandardnými spôsobmi v médiu, ktoré obsahovalo sérum. V nahých myšiach sa

pomocou týchto línii vyvolal vznik nádorových xenograftov, ktoré sa odobrali z týchto myší približne 4 - 6 týždňov po implantácii. Z nádorov sa štandardnými spôsobmi izolovala RNA.

Analýza PCR založená na Taqman sa uskutočnila využitím primérov:

CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (sekvencia SEQ ID NO: 3) a

5 GCC GCG TCC GCA AAG (sekvencia SEQ ID NO: 4) a

sonda Taqman

6 - FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (sekvencia SEQ ID NO: 5).

Tieto priméry a sonda boli navrhnuté pomocou software Perkin Elmer Primer Express a syntetizované pomocou Synthetic Genetics. Reakcie PCR sa uskutočnili v 30 - 40 cykloch a kvantifikované pomocou prostatickej RNA na vytvorenie štandardnej krivky na relatívne porovnávanie. Touto analýzou sa dokázalo, že najvyššie množstvo *rgl* mRNA sa našlo v prostate a významne nižšie hladiny v iných tkanivách (pozri obr. 5).

Príklad 3

15 Klonovanie a expresia RG1 v bunkách BHK

Kódujúca oblasť pre RG1 sa získala z plazmidu Incyte 3360733. Táto kódujúca sekvencia sa amplifikovala pomocou PCR s primérm:

SST115 (5' - TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCCGGC- 3') (sekvencia SEQ ID NO: 6)

a SST113 (5' - AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG- 3') (sekvencia SEQ ID NO: 7)

20 v štandardnej PCR reakcii (100 μ l) s použitím 1 x *Pfu* pufru Turbo polymerázy (Stratagene, La Jolla, CA)/200 (μ M každého dNTP/0,2 (μ M oligonukleotidových primérov/2,5 U *Pfu* Turbo polymerázy (Stratagene). Podmienky na amplifikáciu PCR boli nasledujúce: 3 min. pri 95 °C (15 s pri 95 °C, 30 s pri 60 °C, 2 min. pri 72 °C) x 35, 72 °C po 7 min. Výsledný amplifikovaný produkt sa prečistil na kolóne QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA) a štiepil reštrikčnými enzýmami *Xba*I a *Pml*I na fragment s 1010 bp, ktorý sa vyčistil na 1 % agarózovom géli pomocou súpravy BIO 101 GeneClean Kit (Vista, CA). Purifikovaný fragment sa ligoval (pomocou Epicentre Fast Link Kit (Epicenter, Madison, WI) do necytopatického expresného vektora Sindbis pSINrep21 (Agapov et al., 1998, PNAS 95: 12989 - 12994) štiepeného *Xba*I a *Pml*I, použil sa na transformáciu kompetentných buniek DH5 α (Life Technologies, Gaithersburg, CA) a selektoval na platniach s LB agarom obsahujúcim ampicilín (100 (μ g/ml). Jedna z týchto kolónií rezistentných na ampicilín sa pomnožila v médiu LB obsahujúcom ampicilín a sekvenčnou analýzou sa v nej dokázala prítomnosť kódujúcej sekvencie pre RG1. Tento plazmid sa nazval pPEG6.

35 Dva mikrogramy pPEG6 sa použili na transfekciu 1-3 x 10⁵ buniek BHK (bovine hamster kidney cells) pomocou látky Lipofectamine Plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD) podľa návodu výrobcu. Po transfekcii sa bunky inkubovali v médiu DMEM obsahujúcom fetálne sérum počas 24 - 48 hod. potom sa 10-krát zriedili a selekcia buniek obsahujúcich plazmid sa iniciovala pridaním puromycínu (konečná koncentrácia 2,5 μ g/ml) a média DMEM obsahujúceho sérum. Keď boli bunky konfluentné (4 - 5 dní po pridaní puromycínu), premyli sa PBS, 10- krát zriedili a pridalo sa médium DMEM obsahujúce sérum a 5 μ g/ml puromycínu. Po ďalších 2 - 3 dňoch sa médium vymenilo za DMEM bez séra obsahujúceho 5 μ g/ml puromycínu, bunky ďalej rástli 2 - 3 dni a potom sa prítomnosť proteínu RG1 v médiu stanovila Western analýzou pomocou protilátok proti RG1. Stanovené množstvo proteínu RG1 bolo 1 μ g/ml.

Príklad 4

Príprava protilátok

45 Pripravili sa králičie polyklonálne antiséra proti piatim syntetickým polypeptidovým sekvenciám odvodeným zo sekvencie proteínu RG1. Tieto sekvencie sa vybrali podľa ich vopred odhadnutej polohy na povrchu proteínu, aby vytvorili antiséra, ktoré by ľahko rozpoznali povrchové epitopy. Na uľahčenie syntézy sa cysteínové zvyšky nahradili kyselinou aminobutánovou (Abu). Špecifické aminokyselinové sekvencie, ich poloha v proteíne RG1 a označenie všetkých piatich peptidov, sú uvedené ďalej.

Označen.	Poloha	Aminokyselinová sekvencia
C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (sekvencia SEQ ID NO: 8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (sekvencia SEQ ID NO: 9)
3C	77-91	HSSDYSMWRKNQYVS (sekvencia SEQ ID NO: 10)
4C	188-210	DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (sekvencia SEQ ID NO: 11)
5C	263-274	NEIVDSASVPET (sekvencia SEQ ID NO: 12)

50

Peptidy sa kovalentne viazali cez ďalší C-koncový cysteín na farbivo KLH (keyhole limpet hemocyanín), aby ich bolo možné využiť ako imunogény. Podobne sa pripravili konjugáty s boviným sérovým albumínom (BSA) na analýzu titra antisér testom ELISA.

Každým peptidom sa imunizovali dve zvieratá. Počiatočné imunizácie sa uskutočnili vo Freundovom kompletnom adjuvans (0,5 mg/zviera) a následné podporné imunizácie sa uskutočňovali v trojtýždňových intervaloch pomocou dávky 0,25 mg/zviera vo Freundovom nekompletnom adjuvans intramuskulárne. Uskutočnili sa pravidelné odbery a titer protilátok proti špecifickým konjugátom BSA-peptid sa meral testom ELISA a porovnával sa s preimúnnym sérom. Dokázalo sa, že antiséra proti peptidom 1C a 3C sú aktívne. Antiséra proti peptidom 2C nerozpoznávali polypeptid RG1. Antiséra proti peptidom 4C a 5C sa testovali.

Ľudské monoklonálne protilátky proti RG1 sa pripravili imunizáciou transgénnych myší proti peptidom RG1 a fúznemu proteínu značenému 6-histidínovou značkou exprimovanému v *E. coli*. Splenocyty týchto zvierat sa fúzovali s myelómovými bunkami, čím vznikli hybridómové bunky. Výsledné hybridómy sa testovali testom ELISA, aby sa získali hybridómy produkujúce protilátky proti peptidom a proteínu RG1.

Príklad 5

Analýza protilátok metódou Western blot

Špecifita antisér pre RG1 sa testovala spôsobom Western blot. Antiséra špecifické pre RG1 (získané proti sekvenciám 1C a 3C už uvedeným) sa testovali pomocou RG1 prechodne exprimovaného v bunkách COS, natívneho RG1 sekretovaného bunkami LNCaP a RG1 produkovaného bunkami BHK (baby hamster kidney cells). Antiséra špecifické pre RG1 sa ďalej testovali lyzátnymi prípravkami z: nádorov LNCaP, buniek LNCaP, nádorov PC3, buniek PC3 a ďalších klinických vzoriek ľudských nádorov prostaty. Bunky a tkanivá sa lyzovali v detergentovom pufri. Po 5 min. povarenia sa 10 µl každého lyzátu nanieslo na 12 % SDS-polyakrylamidový gél na rozdelenie proteínov. Rozdelené proteíny potom sa preniesli na nitrocelulózovú membránu. Väzbová špecifita protilátok proti RG1 sa overila väzbou v prítomnosti homológnych a heterológnych proteínov. Pomocou antisér špecifických pre RG1 sa prítomnosť proteínov dokázala vo všetkých vzorkách okrem buniek PC-3 a nádorov PC-3.

Príklad 6

Purifikácia natívneho proteínu RG1 sekretovaného bunkami LNCaP

Analýza spôsobom Western blot dokázala, že bunky LNCaP sekretujú natívny proteín RG1. Na purifikáciu natívneho proteínu sa bunky ponechali rásť počas 48 hodín v médiu bez séra. Toto médium bez séra sa potom odobrálo a centrifugovalo tak, aby sa odstránili všetky bunky, a približne 50x sa koncentrovalo ultrafiltráciou. Koncentrované médium sa potom 10x zriedilo 20 mM pufrum octanu sodného, pH 6,5 a nanieslo na kolónu na výmenu aniónov Q-Sepharose. Elúcia z kolóny sa uskutočnila gradientom chloridu sodného (0,5 % za min.), pričom sa odoberali 2,0 ml frakcie. Ako sa potvrdilo spôsobmi Western blot a SDS PAGE, frakcie obsahujúce proteín RG1 sa vymyli pri koncentrácii približne 5 mM NaCl. Natívny proteín RG1 sa pohybuje pri mierne nižších molekulových hmotnostiach než fúzny proteín 6-histidín-RG1 exprimovaný v baktériách, zrejme pretože neobsahuje fúzny peptid.

Príklad 7

Imunohistochemické farbenie expresie RG1

Expresia proteínu RG1 sa stanovila firmou LifeSpan Biosciences, Inc., v rôznych typoch ľudských tkanív ako sú obličky, pľúca, pankreas, svaly, mozog a prostata. Ďalšie tkanivá prostaty sa získali z Urologickej katedry lekárskej fakulty Stanfordovej univerzity a testovali sa v Berlex. Tkanivové rezy sa zbavili parafínu pomocou štandardných spôsobov. Polyklonálna protilátka RG1-3C sa použila ako primárna protilátka a ako detekčný systém sa použila súprava Vector ABC-AP (AK5002) so súpravou Vector red substrate (Sk5002). Ako negatívna kontrola sa uskutočnilo farbenie za neprítomnosti primárnej protilátky.

Všetky publikácie a patenty uvedené v opise sú v plnom rozsahu zahrnuté do opisu formou odkazu. Zatiaľ čo predkladaný vynález je opísaný s odkazom na špecifické uskutočnenia, odborníkovi je zrejme, že je v ňom možné uskutočňovať rôzne zmeny a ekvivalentné nahradenia, bez toho, aby došlo k odchýleniu od vynálezeckej myšlienky a rozsahu tohto vynálezu. Navyše môže byť uskutočnené mnoho modifikácií na prispôbenie sa určitej situácii, materiálu, zlúčeniny alebo látky, spôsobu, kroku či krokov určitého spôsobu na účely, zámer a rozsah tohto vynálezu. Všetky tieto modifikácie spadajú do rozsahu vynálezu vymedzeného pripojenými patentovými nárokmi.

Zoznam sekvencií

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

<120> DNA kódujúca polypeptid RG-1

<130> 51791AUSM1

<140>

<141>

<150> 60/172, 370

<151> 1999-12-16

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (296)..(1291)

<400> 1

```

agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agaggggtgat ccgacccggg gaaggtcgct 60
gggcagggcg agttgggaaa.gcggcagccc ccgccgcccc cgcagccctt tctcctcctt 120
tctcccacgt cctatctgcc tctcgctgga ggccagggcg tgcagcatcg aagacaggag 180
gaactggagc ctcatctggc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaaata ggagctccgg 240
gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctcccgc tgetcctgcc ggggtg atg 298
                                                    Met
                                                    1

gaa aac ccc agc ccg gcc gcc gcc ctg ggc aag gcc ctc tgc gct ctc 346
Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala Leu
                    5                      10                      15

ctc ctg gcc act ctc ggc gcc gcc ggc cag cct ctt ggg gga gag tcc 394
Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
                    20                      25                      30

atc tgt tcc gcc gga gcc ccg gcc aaa tac agc atc acc ttc acg ggc 442
Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
                    35                      40                      45

```

aag tgg agc cag acg gcc ttc ccc aag cag tac ccc ctg ttc cgc ccc	490
Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro	
50 55 60 65	
cct gcg cag tgg tct tcg ctg ctg ggg gcc gcg cat agc tcc gac tac	538
Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr	
70 75 80	
agc atg tgg agg aag aac cag tac gtc agt aac ggg ctg cgc gac ttt	586
Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe	
85 90 95	
gcg gag cgc gcc gag gcc tgg gcg ctg atg aag gag atc gag gcg gcg	634
Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala	
100 105 110	
ggg gag gcg ctg cag agc gtg cac gcg gtg ttt tcg gcg ccc gcc gtc	682
Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val	
115 120 125	
ccc agc gcc acc ggg cag acg tcg gcg gag ctg gag gtg cag cgc agg	730
Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg Arg	
130 135 140 145	
cac tcg ctg gtc tcg ttt gtg gtg cgc atc gtg ccc agc ccc gac tgg	778
His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp	
150 155 160	
ttc gtg gcc gtg gac agc ctg gac ctg tgc gac ggg gac cgt tgg cgg	826
Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp Arg	
165 170 175	
gaa cag gcg gcg ctg gac ctg tac ccc tac gac gcc ggg acg gac agc	874
Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp Ser	
180 185 190	
ggc ttc acc ttc tcc tcc ccc aac ttc gcc acc atc ccg cag gac acg	922
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr	
195 200 205	
gtg acc gag ata acg tcc tcc tct ccc agc cac ccg gcc aac tcc ttc	970
Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe	
210 215 220 225	
tac tac cca cgg ctg aag gcc ctg cct ccc atc gcc agg gtg aca ctg	1018
Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr Leu	
230 235 240	
gtg cgg ctg cga cag agc ccc agg gcc ttc atc cct ccc gcc cca gtc	1066
Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro Val	
245 250 255	
ctg ccc agc agg gac aat gag att gta gac agc gcc tca gtt cca gaa	1114
Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu	
260 265 270	

acg ccg ctg gac tgc gag gtc tcc ctg tgg tgc tcc tgg gga ctg tgc 1162
 Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys
 275 280 285

gga ggc cac tgt ggg agg ctc ggg acc aag agc agg act cgc tac gtc 1210
 Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val
 290 295 300 305

cgg gtc cag ccc gcc aac aac ggg agc ccc tgc ccc gag ctc gaa gaa 1258
 Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu
 310 315 320

gag gct gag tgc gtc cct gat aac tgc gtc taa gaccagagcc ccgcagcccc 1311
 Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
 325 330

tgggggcccc cggagccatg ggggtgtcggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg 1371

ccgagggcac aggggggttc gcgctgtccc tgaccgcggt gagggcgcgc cgaccatctc 1431

tgcaactgaag ggccctctgg tggccggcac gggcattggg aaacagcctc ctcccttccc 1491

aaccttgctt cttagggggcc cccgtgtccc gtctgtcttc agcctcctcc tcctgcagga 1551

taaagtcac ccgaaggctc cagctactct aaattatgtc tccttataag ttattgctgc 1611

tccaggagat tgccttcat cgtccagggg cctggctccc acgtgggtgc agatacctca 1671

gacctggtgc tctaggctgt gctgagccca ctctcccag ggcgcacca agcggggggcc 1731

acttgagaag tgaataaatg gggcggtttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa 1785

<210> 2

<211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Phe Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala
 100 105 110
 Ala Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala
 115 120 125
 Val Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg
 130 135 140
 Arg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp
 145 150 155 160
 Trp Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp
 165 170 175
 Arg Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp
 180 185 190
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp
 195 200 205
 Thr Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser
 210 215 220
 Phe Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro
 245 250 255
 Val Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro
 260 265 270
 Glu Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu
 275 280 285
 Cys Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr
 290 295 300
 Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
 325 330

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: primér

<400> 3

cgcgcatagc tccgactac

<210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér

<400> 4
 gccgcgtccg caaag

15

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: sonda

<400> 5
 aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg

30

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér

<400> 6
 tccctctaga gccaccatgg aaaaccccag cccggc

36

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: primér

<400> 7
 aaggcatcac gtggttagacg cagttatcag ggacg

35

<210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 8

Pro	Leu	Gly	Gly	Glu	Ser	Ile	Cys	Ser	Ala	Gly	Ala	Pro	Ala	Lys	Tyr
1				5					10					15	

Ser Ile Thr

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid2

<400> 9

Thr	Phe	Thr	Gly	Lys	Trp	Ser	Gln	Thr	Ala	Phe	Pro	Lys	Gln	Tyr	Pro
1				5					10					15	

Leu Phe Arg

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 10

His	Ser	Ser	Asp	Tyr	Ser	Met	Trp	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	Val	Ser
1				5					10					15

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 11

Asp	Ala	Gly	Thr	Asp	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Pro	Asn	Phe	Ala
1				5					10					15	

Thr	Ile	Pro	Gly	Asp	Thr	Val
				20		

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: peptid

<400> 12

Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr

1

5

10

PATENTOVÉ NÁROKY

5 1. Izolovaná protilátka alebo fragment protilátky, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, ako je uvedený v SEQ ID NO: 2, pričom protilátka sa špecificky viaže na člen zvolený zo skupiny pozostávajúcej z:

a) polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 77 až aminokyselinu 91 uvedené na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);

b) polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 263 až aminokyselinu 274 uvedené na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);

na použitie ako liečivo.

10 2. Protilátka na použitie ako v nároku 1, kde protilátkou je polyklonálna alebo monoklonálna protilátka.

3. Protilátka na použitie ako v niektorom z nárokov 1 alebo 2, kde fragment protilátky je zvolený zo skupiny pozostávajúcej z Fv, F(ab') a F(ab')₂ fragmentov.

4. Imunokonjugát obsahujúci izolovanú protilátku alebo fragment protilátky podľa nároku 1, 2 alebo 3, ktoré sa špecificky viažu na RG1 polypeptid, ako je uvedený v SEQ ID NO: 2, pričom izolovaná protilátka

15 alebo jej fragment sa špecificky viažu na člen zvolený zo skupiny pozostávajúcej z:

a) polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 77 až aminokyselinu 91 uvedené na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);

b) polypeptidu obsahujúceho aminokyselinu 263 až aminokyselinu 274 uvedené na obr. 2 (SEQ IN NO: 2);

konjugované s terapeutickým činidlom, na použitie ako liečivo.

5. Imunokonjugát podľa nároku 4, kde terapeutickým činidlom je cytotoxické činidlo.

20 6. Imunokonjugát podľa nároku 5, kde cytotoxické činidlo je zvolené zo skupiny pozostávajúcej z ricínu, doxorubicínu, daunorubicínu, taxolu, etidíumbromidu, mitomycínu, etoposidu, tenoposidu, vinkristínu, vinblastínu, kolchicínu, dihydroxyantracindiónu, aktinomycínu D, difterického toxínu, *Pseudomonas* exotoxínu (PE) A, PE40, abrinu, glukokortikoidu a rádioizotopov.

9 výkresov

Obr. 1

```

1  AGAAAGCGGT GCGGCAGCAC TGCCAGGGGA AGAGGGTGAT CCGACCCGGG
51  GAAGGTCGCT GGGCAGGGCG AGTTGGGAAA GCGGCAGCCC CCGCCGCCCC
101 GGCAGCCCCT TCTCCTCCTT TCTCCCACGT CCTATCTGCC TCTCGCTGGA
151 GGCCAGGCCG TGCAGCATCG AAGACAGGAG GAACTGGAGC CTCATTGGCC
201 GGGCCGGGGC GCCGGCCTCG GGCTTAAATA GGAGCTCCGG GCTCTGGCTG
251 GGACCCGACC GCTGCCGGCC GCGCTCCCGC TGCTCCTGCC GGGTGATGGA
301 AAACCCAGC CCGGCCGCCG CCCTGGGCAA GGCCCTCTGC GCTCTCCTCC
351 TGGCCACTCT CGGCGCCGCC GGCAGCCTC TTGGGGGAGA GTCCATCTGT
401 TCCGCCGGAG CCGCGGCCAA ATACAGCATC ACCTTCAGGG GCAAGTGGAG
451 CCAGACGGCC TTCCCAAGC AGTACCCCT GTTCCGCCCC CCTGCGCAGT
501 GGTCTTCGCT GCTGGGGGCC GCGCATAGCT CCGACTACAG CATGTGGAGG
551 AAGAACCAGT ACGTCAGTAA CCGGCTGCCG GACTTTGCGG AGCGCGGCGA
601 GGCCTGGGCG CTGATGAAGC AGATCGAGGC GCGGGGGGAG GCGCTGCAGA
651 GCGTGACGCG GGTGTTTTCG GCGCCCGCCG TCCCAGCGG CACCGGGCAG
701 ACGTCGGCGG AGCTGGAGGT GCAGCGCAGG CACTCGCTGG TCTCGTTTGT
751 GGTGCGCATC GTGCCAGCC CCGACTGGTT CGTGGGCGTG GACAGCCTGG
801 ACCTGTGCGA CCGGGACCGT TGGCGGGAAC AGGCGGCGCT GGACCTGTAC
851 CCCTACGAGC CCGGGACGGA CAGCGGCTTC ACCTTCTCCT CCCCCAACTT
901 CGCCACCATC CCGCAGGACA CCGTGACCGA GATAACGTCC TCCTCTCCCA
951 GCCACCCGGC CAACTCCTTC TACTACCCAC GGCTGAAGGC CCTGCCCTCC
1001 ATCGCCAGGG TGACACTGCT GCGGCTGCGA CAGAGCCCCA GGGCCTTCAT
1051 CCCTCCCGCC CCAGTCCTGC CCAGCAGGGA CAATGAGATT GTAGACAGCG
1101 CCTCAGTTCC AGAAACGCCG CTGGACTGCG AGGTCTCCCT GTGGTCGTCC
1151 TGGGGACTGT GCGGAGGCCA CTGTGGGAGG CTCGGGACCA AGAGCAGGAC
1201 TCGCTACGTC CGGSTCCAGC CCGCCAACAA CGGGAGCCCC TGCCCCGAGC
1251 TCGAAGAAGA GGCTGAGTGC GTCCCTGATA ACTGCGTCTA AGACCAGAGC

```

Obr. 1 - pokračovanie

1301 CCCGCAGCCC CTGGGGCCCC CCGGAGCCAT GGGGTGTGGG GGGCTCCTGT
 1351 GCAGGCTCAT GCTGCAGGCG GCCGAGGGCA CAGGGGGTTT CGCGCTGCTC
 1401 CTGACCGGGG TGAGGCCGCG CCGACCATCT CTGCACTGAA GGGCCCTCTG
 1451 GTGGCCGGCA CGGGCATTGG GAAACAGCCT CCTCCTTTCC CAACCTTGCT
 1501 TCTTAGGGGC CCCCGTGTCC CGTCTGCTCT CAGCCTCCTC CTCCTGCAGG
 1551 ATAAAGTCAT CCCCAAGGCT CCAGCTACTC TAAATTATGT CTCCTTATAA
 1601 GTTATTGCTG CTCAGGAGA TTGTCCTTCA TCGTCCAGGG GCCTGGCTCC
 1651 CACGTGGTTG CAGATACCTC AGACCTGGTG CTCTAGGCTG TGCTGAGCCC
 1701 ACTCTCCGA GGGCGCATCC AAGCGGGGGC CACTTGAGAA GTGAATAAAT
 1751 GGGGCGGTTT CGGAAGCGTC AAAAAAAAAA AAAAA

Obr. 2

1 MENPSPAAAL GKALCALLLA TLGAAGQPLG GESICSAGAP AKYSITETGK
 51 HSOTAEPKOY PLFRPPAOWS SLLGAHSSD YSMWRKNOYV SNGLRDEFAE
 101 GEAWALMKEI EAAGEALQSV HAVFSAPAVP SGTGQTSDEL EVORRHSLVS
 151 FVYRIYPSPD HFYGVDSL DL CDGDRWREOA ALDLYPYDAG TDSGETESSP
 201 NEATIPQDTV TEJTSSSPSH PANSFYYPRL KALPPIARVT LVRLRQSPRA
 251 FIPPAPVLPS RDNEIVDSAS VPETPLDCEV SLWSSWGICG GHCGRLGTKS
 301 RTRYVRVOPA NNGSPCPELE FEAECVPDNC V

Obr. 3

```

RG1      1 MENPSPAAALGKALCALLLATLGA.AGOPLGGESICSAGAPAKYSITFTG 49
      ||| | .| : | || |. |||||:|. | :|||
mindin 1 MENVS..FSLDRTLWVFLAMLGSTAGOPLGESVCTARPLARYSITFTG 48

      50 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAHSSDYSMWRKNQYVSNGLRDFAE 99
      |||||:|||||
      49 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAHSSDYSMWRKNEYVSNGLRDFAE 98

      100 RGEAWALMKEIEAAGEALQSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVQRRHSLV 149
      |||||:|||||
      99 RGEAWALMKEIEAAGEKLQSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVHPRHSLV 148

      150 SFVVRIVPSPDWFGVDSLDCDGRWREOAALDLYPYDAGTDSGFTFSS 199
      |||||:||||| ||:| ||||:|||||
      149 SFVVRIVPSPDWFGIDSLDCEGGRWKEQVVDLYPHDAGTDSGFTFSS 198

      200 PNFATIPQDTVTEITSSSPSHPANSFYYPRLKALPPIARVTLVRLRQSPR 249
      |||||:||||| ||||:|||||
      199 PNFATIPQDTVTEITASSPSHPANSFYYPRLKSLPPIAKVTFVRLRQSPR 248

      250 AFIPPAPVLPSRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGHCGRIGTK 299
      || ||. | || |||| |||||:|||||
      249 AFAPPSLDLASRGNEIVDSLVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGPCGKLGAK 298

      300 SRTRYVRVQPANNGSPCPELEEEAECVPDNCV 331
      |||||:|||||
      299 SRTRYVRVQPANNGTPCPELEEEAECAPDNCV 330

```

Obr. 4

1 AGAAAGGGGTGCGGCAGCACTGCCAGGGGAAGAGGGTGATCCGACCCGGGGAAGGTTCGCT 60
 TCTTTCCCCACGCCGTCGTGACGGTCCCTTCTCCCACTAGGCTGGGCCCTTCCAGCGA
 61 GGGCAGGGCGAGTTGGGAAAGCGGCAGCCCCCGCGCCCCCGCAGCCCTTCTCCTCCTT 120
 CCGCTCCCGCTCAACCTTTTCGCGTCGGGGGCGGCGGGCGCTCGGGGAAGAGGAGGAA
 121 TCTCCACGTCCTATCTGCCTCTCGCTGGAGGCCAGGCCGTGCAGCATCGAAGACAGGAG 180
 AGAGGGTGCAGGATAGACGGAGAGCGACCTCCGGTCCGGEACGTCGTAGCTTCTGTCTC
 181 GAACTGGAGCCTCATTTGCCGGCCCCGGGGCGCGGCTCGGGCTTAAATAGGAGCTCCGG 240
 CTTGACCTCGGAGTAACCGGCCGGGCCCGCGCGGAGCCCGAATTATCCTCGAGGCC
 241 GCTCTGGCTGGGACCCGACCGCTGCGGGCGCGCTCCCGCTGCTCCTGCGGGGTGATGGA 300
 CGAGACCGACCTGGGCTGGCGACGGCGCGCGAGGGCGACGAGGACGGCCCACTACCT
 b H E -
 301 AAACCCAGCCCGGCCCGCCCTGGGCAAGGCCCTCTGCGCTCTCCTCCTGGCCACTCT 360
 TTTGGGGTCGGGCCGGCGGGGACCCGTTCCGGGAGACGCGAGAGGAGGACCGGTGAGA
 b N P S P A A A L G K A L C A L L L A T L -
 361 CGGCGCGCCCGCCAGCCTCTTGGGGGAGAGTCCATCTGTTCCGCCGGAGCCCCGGCCAA 420
 GCCGCGCGCGCGGTGCGGAGAACCCCTCTCAGGTAGACAAGGCGGCCTCGGGCGCGGT
 b G A A G Q P L G G E S I C S A G A P A K -
 421 ATACAGCATCACCTTCACGGGCAAGTGCAGCCAGACGGCCTTCCCAAGCAGTACCCCT 480
 TATGTCGTAGTGAAGTGCCTTACCTCGGTCTGCCGAAGGGGTTCGTTCATGGGGGA
 b Y S I T F T G K W S Q T A F P K Q Y F L -
 481 GTTCCGCCCCCTGCGCAGTGGTCTTCGCTGCTGGGGGCGCGCATAGCTCCGACTACAG 540
 CAAGCGGGGGGACCGCTCACCAGAAGCGACGACCCCGGGCGGTATCGAGGCTGATGTC
 b F R P P A Q W S S L L G A A H S S D Y S -
 541 CATGTGGAGGAAGAACCAGTACGTACGTAACGGGCTCGCGGACTTTGCGGAGCGCGCGGA 600
 GTACACCTCCTTCTTGGTCAATGAGTCATTGCCCGACGCGGTGAAACGCCTCGCGCGCT
 b M W R K N Q Y V S N G L R D F A E R G E -
 601 GGCCTGCGCGCTGATGAAGGAGATCGAGGCGGGGGGAGGCGCTGCAGAGCGTGCACGC 660
 CCGGACCCCGGACTACTTCTCTAGCTCCGCGCCCCCTCCGCGACGTCTCGCACGTCCG
 b A W A L M K E I E A A G E A L Q S V H A -
 661 GGTGTTTTTCGGCGCCCGCCCTCCCAAGCGCCACCGGCGAGACGTGCGCGGAGCTGGAGGT 720
 CCACAAAAGCCGCGGGCGCGAGGGCTGCGCGTGGCCGCTCTCCAGCCGCTCGACCTCCA
 b V F S A P A V P S C T G O T S A E L E V -

Obr. 4 - pokračovanie

```

1501 TCTTAGGGGCCCCCGTGTCCCGTCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCCTGCAGGATAAAGTCAT 1550
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAATCCCCGGGGGCACAGGGCAGACGAGAGTCGGAGGAGGAGGACGTCCTATTTTCAGTA

1561 CCCCCAAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGTCTCCTTATAAGTTATTGCTGCTCCAGGAGA 1620
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGTTCCGAGGTCGATGAGATTTAATACAGAGGAATATTCAATAACGACGAGGTCCTCT

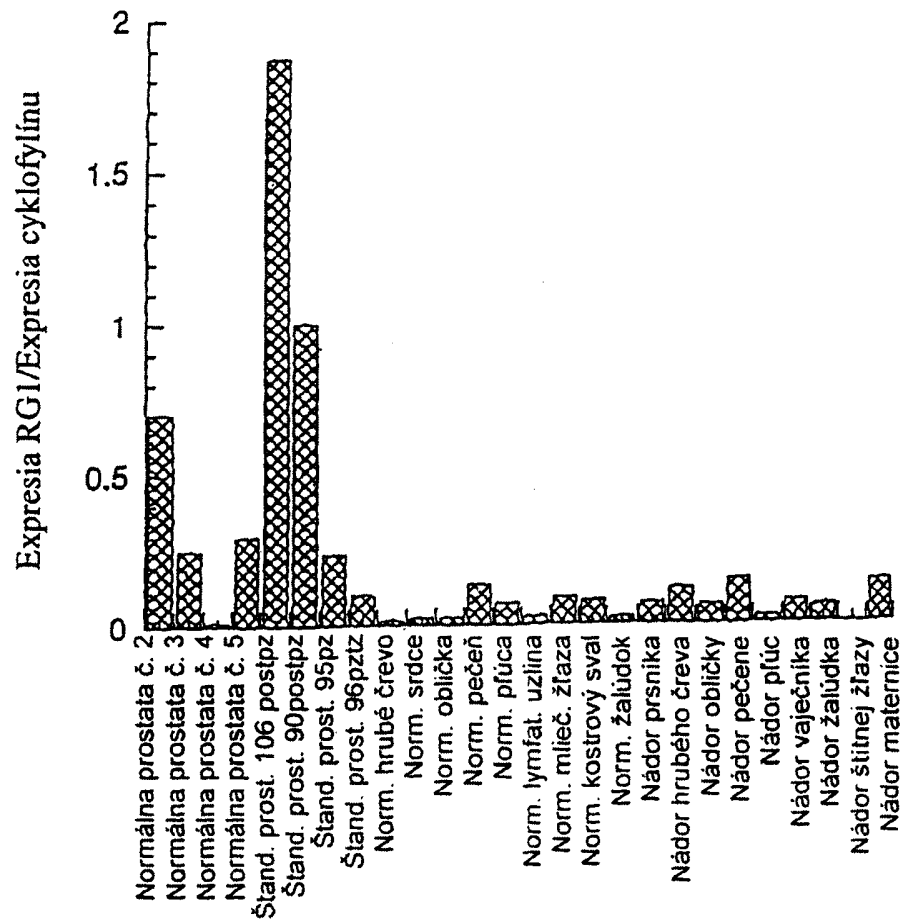
1621 TTGTCCTTCATCGTCCAGGGGCTGGCTCCACGTTGGTTGCAGATACCTCAGACCTGGTG 1680
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAGGAAGTAGCAGGTCCCCGGACCGAGGGTGCAACCAACGCTCTATGGAGTCTGGACCAC

1681 CTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACTCTCCCGAGGGCGCATCCAAGCGGGGGCCACTTGAGAA 1740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATCCGACACGACTCGGGTCAGAGGGCTCCCGCGTAGGTTCCGCCCCGGGTGAACCTTT

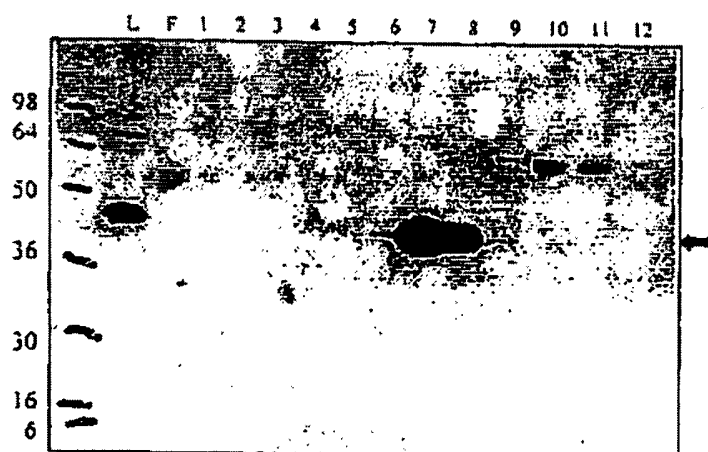
1741 GTCAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTC 1770
-----+-----+-----+-----+
CACTTATTTACCCCGCCAAAGCCTTCGCAG

```

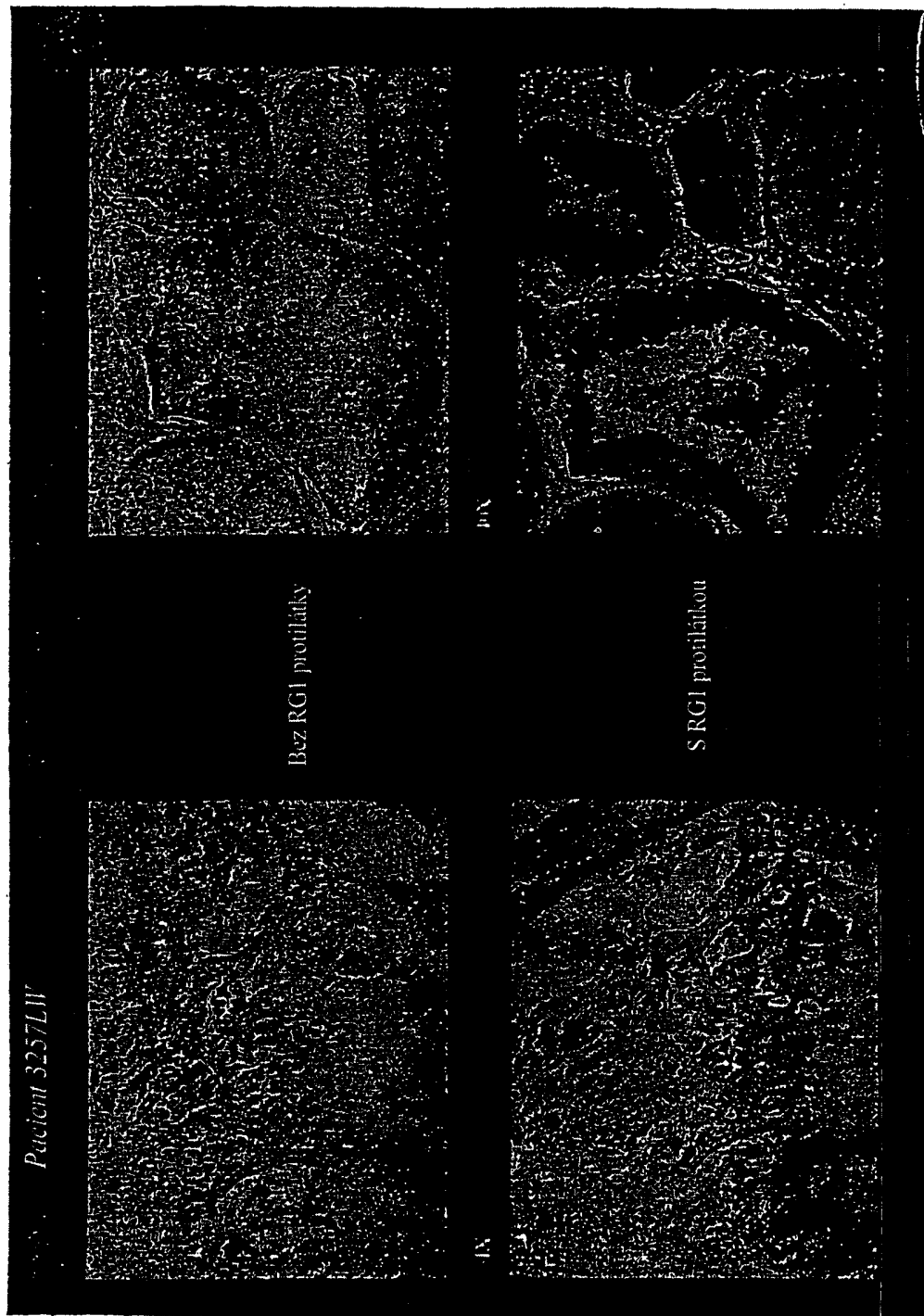
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Koniec dokumentu