

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393534 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.15

(51) Int. Cl. C12N 9/64 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.06.08

(54) НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЕ СЛИТНЫЙ БЕЛОК KLK2-GPI,  
РЕКОМБИНАНТНЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/209,019

(32) 2021.06.10

(33) US

(86) PCT/IB2022/055355

(87) WO 2022/259190 2022.12.15

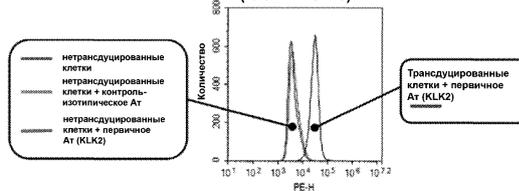
(71) Заявитель:  
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Эманьюэл Стюарт Л., Руткоски Томас  
Дж. (US)

(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантному нуклеотидному конструкту, кодирующему слитный белок калликреина-2. Слитный белок калликреина-2 включает первую нуклеотидную последовательность, кодирующую калликреин-2 (KLK2), и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), причем нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, расположена с 3' стороны от нуклеотидной последовательности, кодирующей KLK2. Кроме того, описаны векторы, препараты клеток и способы их применения.

Экспрессия KLK2 на поверхности  
(клетки DU145)



A1

202393534

202393534

A1

## НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЕ СЛИТНЫЙ БЕЛОК KLK2-GPI, РЕКОМБИНАНТНЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

5

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНУЮ ЗАЯВКУ

[0000] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент Соединенных Штатов Америки с серийным номером 63/209,019, поданной 10 июня 2021 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

10

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0000.1] Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 21 апреля 2022 г., называется JBI6578WOPCT1\_SL.txt и имеет размер 33 873 байт.

15

### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение относится к нуклеотидным конструктам, кодирующим слитные белки калликреина-2, а также векторы, препараты клеток и способы их применения.

20

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Семейство человеческих калликреинов (KLK) состоит из 15 сериновых протеаз с различными биологическими функциями и распределением по тканям (Thorek et al., *Thromb. Haemost.* 110(30):4840–92 (2013)). Калликреин-2 (KLK2) имеет высокую и избирательную экспрессию в нормальной предстательной железе, при первичном раке предстательной железы и при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы. Его экспрессия регулируется андрогенами и сильно коррелирует с экспрессией андрогеновых рецепторов. Его тканевая специфичность делает его подходящей мишенью для терапевтических средств против рака предстательной железы. Однако KLK2 (также называемый hK2, UniProt P20151) представляет собой секретируемый белок в каталитически активной форме, который часто присоединен к поверхности клеток опухоли предстательной железы посредством неизвестных механизмов. Он в высокой степени и избирательно экспрессируется в нормальной предстательной железе, при первичном раке предстательной железы и при

25

30

метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы, что делает его подходящей мишенью для средств терапии рака предстательной железы. Имеется ограниченное число доступных в продаже опухолевых клеток предстательной железы, экспрессирующих эндогенный KLK2 на клеточной поверхности. Линии опухолевых клеток VCaP и LNCaP экспрессируют обнаруживаемый KLK2 на клеточной поверхности, хотя и с очень низким уровнем по сравнению с первичными опухолевыми клетками. Отсутствие соответствующих линий опухолевых клеток затрудняет идентификацию и утверждение потенциальных терапевтических средств, которые вмешиваются в путь KLK2.

10 **[0003]** Были предприняты попытки сверхэкспрессировать KLK2 в KLK2-негативных линиях опухолевых клеток предстательной железы DU145 и PC3, а также во многих других линиях клеток. Однако ни в одном случае не смогли получить линии опухолевых клеток с экспрессией KLK2 на поверхности, поскольку белок KLK2 экспрессировался внутриклеточно или секретировался во внеклеточный матрикс

15 (например, CHO-K1, HEK293, NS0, LnCap).

**[0004]** Настоящее изобретение направлено на решение этих и других проблем, возникающих в данной области.

### **ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0005]** Первый аспект настоящего описания относится к рекомбинантному нуклеотидному конструкту, кодирующему слитный белок калликреина-2.

20 Рекомбинантный нуклеотидный конструкт содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую калликреин-2 (KLK2), и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), причем указанная вторая нуклеотидная

25 последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, расположена с 3' стороны от первой нуклеотидной последовательности, кодирующей калликреин-2.

**[0006]** Другой аспект настоящего описания относится к препарату клеток, причем клетки препарата экспрессируют на своей поверхности рекомбинантный слитный белок

30 калликреина-2. Слитный белок включает полипептидную последовательность калликреина-2, участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2; и домен GPI-анкера, соединенный с участком последовательности присоединения GPI.

**[0007]** Дополнительный аспект настоящего описания относится к животному, не являющемуся человеком, содержащему клетки, экспрессирующие на своей поверхности рекомбинантный слитный белок калликреина-2. Рекомбинантный слитный белок включает полипептидную последовательность калликреина-2; участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2; и домен GPI-анкера, соединенный с участком последовательности присоединения GPI.

**[0008]** Еще один дополнительный аспект настоящего описания относится к способу идентификации агента, который связывается с калликреином-2. Этот способ включает обеспечение препарата клеток в соответствии с настоящим описанием; введение потенциального агента в препарат клеток; и определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2, на основании указанного введения.

**[0009]** Другой аспект настоящего описания относится к способу идентификации агента, который связывается с калликреином-2. Этот способ включает получение животного, не являющегося человеком, в соответствии с настоящим описанием; введение потенциального агента животному, не являющемуся человеком; и определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2, на основании указанного введения.

**[0010]** Описание включает способ конструирования экспрессии калликреина-2 на поверхности клеток посредством создания слитного белка калликреина-2 с последовательностью присоединения к гликозилфосфатидилинозитулу (GPI) из плацентарной щелочной фосфатазы человека (PLAP). Экспрессия белка в трансфицированных клетках приводится в действие промотором EF1 $\alpha$ , а слитный белок калликреина-2 закрепляется на клеточной мембране с помощью GPI-анкерного домена, соединенного с последовательностью присоединения GPI. Этот способ используют для достижения поверхностной экспрессии в клетках, которые не экспрессируют калликреин-2, или для сверхэкспрессии в клетках, экспрессирующих эндогенный калликреин-2. Обычными способами экспрессии калликреина-2 не удавалось обеспечить наличие KLK2 на клеточной поверхности, создавая только внутриклеточную или внеклеточную экспрессию, или экспрессия вообще отсутствовала. Клетки с KLK2, искусственно экспрессированным на поверхности, пригодны для скрининга и идентификации нацеленных на KLK2 терапевтических средств (например, продуктов для клеточной терапии, перенаправляющих антител к CD3, антител, опосредующих антителозависимую клеточно-опосредованную

цитотоксичность (ADCC-опосредующих антител) и т. д.) в анализах высвобождения или в экспериментальных системах *in vitro* или *in vivo*.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

5 [0011] На ФИГ. 1 представлена гистограмма, на которой показана экспрессия KLK2 на поверхности в клетках DU145, трансдуцированных слитным конструктором KLK2-GPI («KLK2\_GPI»), как описано в настоящем документе. Клетки окрашивали изотипическим контролем или антителом к KLK2 (клон KL2B1), непосредственно конъюгированным с PE.

10 [0012] На ФИГ. 2А–2В представлены графики, демонстрирующие связывание изотипического контрольного антитела hIgG1 или KLK2-специфических антител на исходных клетках VCaP (ФИГ. 2А), DU145 (ФИГ. 2Б) или опухолевых клетках DU145/KLK2\_GPI (ФИГ. 2В).

15 [0013] На ФИГ. 3А–3В представлены графики, демонстрирующие связывание изотипических контрольных антител hIgG1 или специфических к KLK2 антител на исходных клетках РС3 (ФИГ. 3А), РС3/KLK2\_GPI (ФИГ. 3Б) или опухолевых клетках РС3/PSMA/KLK2\_GPI (ФИГ. 3В).

20 [0014] На ФИГ. 4А–4В представлены графики, на которых показана антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток VCaP (ФИГ. 4А), исходных клеток DU145 (ФИГ. 4Б) или опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI (ФИГ. 4В). Клетки РВ-НК культивировали совместно с опухолевыми клетками при соотношении Е : Т 3 : 1. Количество живых опухолевых клеток-мишеней подсчитывали через 66 часов с использованием IncuCyte. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся к концу анализа, нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки, для получения % живых опухолевых клеток-мишеней.

25 [0015] На ФИГ. 5А–5Б представлены графики, на которых показана ADCC в отношении исходных клеток РС3 (ФИГ. 5А) или опухолевых клеток РС3/PSMA/KLK2\_GPI (ФИГ. 5Б). РВ-НК клетки совместно культивировали с опухолевыми клетками при соотношении эффекторных клеток и мишеней (Е : Т) 3 : 1 в присутствии антител к KLK2 или изотипического контрольного антитела. Количество живых опухолевых клеток-мишеней подсчитывали через 66 часов с использованием IncuCyte. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся к концу анализа, нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки, для получения % живых опухолевых клеток-мишеней.

**[0016]** На ФИГ. 6 представлен график, на котором показана цитотоксичность биспецифического антитела KLK2 X CD3 в отношении опухолевых клеток VCaP, LnCap/KLK2 или DU145/KLK2\_GPI. Первичные Т-клетки совместно культивировали с опухолевыми клетками при соотношении Е : Т 3 : 1 в присутствии антител к KLK2 или изотипического контрольного антитела. Увеличивающиеся концентрации биспецифических антител KLK2 X CD3 смешивали с опухолевыми клетками и Т-клетками. Количество живых опухолевых клеток-мишеней подсчитывали через 72 часа с использованием IncuCyte. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся к концу анализа, нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки, для получения % лизиса опухоли.

**[0017]** На ФИГ. 7А–7В представлены графики, на которых показана CAR-Т-опосредованная цитотоксичность против VCaP (ФИГ. 7А), исходных клеток DU145 (ФИГ. 7Б) или опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI (ФИГ. 7В). Нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки или Т-клетки, трансдуцированные CAR к KLK2, совместно культивировали с опухолевыми клетками при соотношении Е : Т 0,25 : 1. Количество живых опухолевых клеток-мишеней подсчитывали каждые 24 часа, начиная с момента 0, используя IncuCyte. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся на каждом сроке, нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки, для получения % живых опухолевых клеток-мишеней.

**[0018]** На ФИГ. 8А–8Б представлены графики, демонстрирующие применение опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI и PC3/PSMA/KLK2\_GPI *in vivo*. (ФИГ. 8А) Кинетика роста DU145/KLK2\_GPI и PC3/PSMA/KLK2\_GPI.  $10 \times 10^6$  опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI или  $0,5 \times 10^6$  опухолевых клеток PC3/PSMA/KLK2\_GPI имплантировали на 0 день. Опухоли измеряли штангенциркулем каждые 3 или 4 дня. (ФИГ. 8Б) Эффективность CAR Т-клеток против KLK2 на модели опухоли DU145/KLK2\_GPI.  $10 \times 10^6$  CAR Т-клеток против KLK2 вводили в день 11 после имплантации опухоли. Опухоли измеряли штангенциркулем каждые 3 или 4 дня. CAR Т-клетки против KLK2 ингибировали прогрессирование опухоли и вызывали полную регрессию опухоли.

**[0019]** На ФИГ. 9А–9В показано, как можно использовать клетки DU145 + KLK2 для скрининга конструкций CAR. Панель конструкций CAR (от CAR-a до CAR-bb) трансдуцировали в клетки NK-101. Все эти конструкции содержали один и тот же связывающий домен scFv, специфичный к KLK2, за которым следует шарнирная область CD8a и различные модули сигнальных доменов.

**[0020]** На ФИГ. 10А–10Б показана гистограмма, демонстрирующая экспрессию KLK2 на поверхности клеток LnCap, трансдуцированных слитным конструктом KLK2-GPI («KLK2\_GPI»), описанным в настоящем документе. Клетки окрашивали изотипическим контролем или антителом к KLK2 (клон KL2B1), непосредственно конъюгированным с PE. На ФИГ. 10В представлены графики, на которых показана KLK2 CAR-NK-опосредованная цитотоксичность против исходных (нетрансдуцированных) клеток LnCap или клеток-мишеней LnCap + KLK2, которые культивировали совместно при различных соотношениях E : T. Количество живых опухолевых клеток-мишеней подсчитывали каждые 4 часа, начиная с момента 0, используя IncuCyte. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся на каждом сроке, нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки, для получения % оставшихся живых опухолевых клеток-мишеней. Значение AUC для кривой % живых опухолевых клеток-мишеней за 166 часов определяли для каждого соотношения E : T и наносили на график в виде кривой доза-ответ. Уничтожение клетками врожденного иммунитета или не-CAR-специфическое уничтожение можно определить по исходным клеткам LnCap, тогда как KLK2 CAR-специфическое уничтожение можно оценить в клетках-мишенях LnCap + KLK2.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

**[0021]** Первый аспект настоящего описания относится к рекомбинантному нуклеотидному конструкту, кодирующему слитный белок калликреина-2. Рекомбинантный нуклеотидный конструкт содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую калликреин-2 (KLK2) или его фрагмент, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), причем указанная вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, расположена с 3' стороны от первой нуклеотидной последовательности, кодирующей калликреин-2.

**[0022]** Первая нуклеотидная последовательность рекомбинантного конструкта, кодирующего калликреин-2, может кодировать полипептидную последовательность калликреина-2 млекопитающего, например человеческую, мышиную, бычью, собачью, кошачью, овечью, свиную, медвежью или обезьянью полипептидную последовательность калликреина-2.

**[0023]** В любом варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность, кодирующая калликреин-2 рекомбинантного конструкта, кодирует человеческий калликреин-2 (hKLK2). Как описано в настоящем документе, человеческий калликреин-2 («hKLK2» или «hK2») представляет собой простатспецифический калликреин (см., например, Obiezu et al., “Human Tissue Kallikrein Gene Family: Applications in Cancer,” *Cancer Letters* 224(1):1-22 (2005) и Nasser et al., “Human Tissue Kallikreins: Blood Levels and Response to Radiotherapy in Intermediate Risk Prostate Cancer,” *Radiother. Oncol.* 124(3):427-432 (2017), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

**[0024]** В любом варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность кодирует человеческий калликреин-2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, или ее функциональный фрагмент.

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLVHPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSLRPDEDSSHDLMLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRS LQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVFTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQGITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEF (сигнальная последовательность показана двойным подчеркиванием) (SEQ ID NO: 4).

**[0025]** В любом варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность кодирует человеческий калликреин-2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или его функциональный фрагмент.

**[0026]** В любом варианте осуществления первая нуклеотидная последовательность, кодирующая калликреин-2, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1 или любым ее участком.

ATGTGGGACCTGGTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCCTGGTGCCGTGCCCTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCACAGCCAGCC TTGGCAAGTGGCAGTGTACTCCCACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTG

CACCCACAATGGGTGCTCACCGCGGCCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCT  
 GGCTGGGACGCCATAACCTGTTCTGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGT  
 GTCCCATTCCCTCCCTCACCCATTGTACAACATGTTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTT  
 TGAGGCCTGATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACC  
 5 CGCAAAGATTACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGC  
 CTTGGGGACTACCTGTTATGCTTCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTC  
 CTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGTGCCTGTCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGT  
 GCGCCAGAGCCTACTCCGAAAAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTG  
 GACCGGGGGAAAGGACACTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAA  
 10 CGGCGTGCTGCAGGGAATTACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAA  
 AAGCCCGCCGTGTACACTAAGGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACC  
 ATCGCCGCGAACCCGGAATTC (SEQ ID NO: 1)

**[0027]** Нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальную  
 последовательность калликреина-2, показана двойным подчеркиванием в SEQ ID NO:  
 15 1. Таким образом, в любом варианте осуществления нуклеотидная последовательность,  
 кодирующая калликреин-2, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.  
 В любом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая  
 калликреин-2, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 без  
 сигнальной последовательности. В любом варианте осуществления нуклеотидная  
 20 последовательность, кодирующая калликреин-2, содержит участок или фрагмент  
 нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

**[0028]** Гликозилфосфатидилинозитол (GPI) представляет собой сложный  
 гликолипид, который служит в качестве мембранного анкера для многих белков  
 клеточной поверхности и встречается повсеместно у эукариот. Как описано в  
 25 настоящем документе, С-конец белка с GPI-анкером связан через  
 фосфоэтаноламиновый мостик с доменом GPI-анкера. Домен GPI-анкера содержит  
 высококонсервативную ядерную гликановую структуру, содержащую манноза ( $\alpha 1-2$ )  
 манноза ( $\alpha 1-6$ ) манноза ( $\alpha 1-4$ ) глюкозамин ( $\alpha 1-6$ ) *мио*-инозит (публикация Paulick &  
 Bertozzi, "The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring  
 30 Structure for Proteins," *Biochemistry* 47(27):6991-7000 (2008), которая полностью  
 включена в настоящий документ путем ссылки). Фосфолипидный хвост присоединяет  
 GPI-анкер к клеточной мембране. Ядерный гликан может быть модифицирован  
 различными боковыми цепями, включая, например, фосфоэтаноламиновую группу,  
 маннозу, галактозу, сиаловую кислоту или другие сахара.

**[0029]** Используемый в настоящем документе термин «последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитола» или «последовательность присоединения GPI» относится к аминокислотной последовательности, которая сигнализирует о ковалентной модификации полипептидной последовательности GPI-анкером. В любом варианте осуществления последовательность присоединения GPI содержит участок гидрофобных аминокислот, которые посттрансляционно расщепляются и заменяются, посредством реакции переамидирования, на GPI-анкер (см., например, Kinoshita, T., “Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series,” *J. Lipid Res.* 57(1):4–5 (2016), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

**[0030]** Рекомбинантный нуклеотидный конструкт, кодирующий слитный белок калликреина-2, как описано в настоящем документе, содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения GPI, причем нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, расположена с 3' стороны от кодирующей калликреин-2 нуклеотидной последовательности. Приемлемые последовательности присоединения GPI включают, без ограничений, последовательности присоединения, встречающиеся в известных белках с GPI-анкером. Например, последовательность присоединения GPI может представлять собой последовательность присоединения GPI щелочной фосфатазы, последовательность присоединения GPI 5'-нуклеотидазы, последовательность присоединения GPI ацетилхолинэстеразы, последовательность присоединения GPI дипептидазы, последовательность присоединения GPI LFA-3 (CD58), последовательность присоединения GPI нейрональной молекулы клеточной адгезии (NCAM), последовательность присоединения GPI стимулятора гемолиза (DAF; CD55), последовательность присоединения GPI CD59, последовательность присоединения GPI Thy-1 (CD90), последовательность присоединения GPI CD14, последовательность присоединения GPI карциноэмбрионального антигена (CEA), последовательность присоединения GPI CD16b и последовательность присоединения GPI фолатсвязывающего белка (Paulick et al., “The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins,” *Biochemistry* 47(27):6991-7000 (2008), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). В таблице 1 представлены различные примеры последовательностей присоединения GPI, которые могут быть кодированы второй нуклеотидной последовательностью рекомбинантного конструкта, описанного в настоящем документе.

**Таблица 1. Примеры последовательностей присоединения GPI**

| <b>Белок с доменом GPI-анкера*</b>  | <b>Последовательность присоединения**</b>               | <b>SEQ ID NO:</b> |
|---|---|-------------------|
| Плацентарная щелочная фосфатаза человека (PLAP)                               | TACDLAPPAGTT <b>D</b> AAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLL<br>ETATAP | 9                 |
| Плацентарная щелочная фосфатаза человека (PLAP)                               | TT <b>D</b> AAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP              | 5                 |
| Человеческий фактор стимуляции гемолиза (DAF; CD55)                           | HETTPNKGGSGTTS <b>G</b> TTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVT<br>MGLLT | 10                |
| Изоформа A4 человеческого эфрина (EFNA4)                                      | PGESGTS <b>G</b> WRGGDTPSPLCLLLLLLLLLLILRLLRIL          | 11                |
| Изоформа A5 человеческого эфрина (EFNA5)                                      | ESAEPSRG <b>E</b> NAAQTPRIPSRLLAILLFLLAMLLTL            | 12                |
| Человеческий фолатный рецептор 1 (FOLR1)                                      | YAAAM <b>S</b> GAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS                  | 13                |
| Изоформа A1 человеческого эфрина (EFNA1)                                      | PEVRVLHSIG <b>H</b> SAAPRLFPLAWTVLLLPLLLLQTP            | 14                |
| Человеческий мембранный белок, ассоциированный с лимбической системой (LSAMP) | SVR <b>G</b> INGSISLAVPLWLLAASLLCLLSKC                  | 15                |
| Человеческий рецептор ретикулона 4 (RTN4R)                                    | DSE <b>G</b> SGALPSLTCSLTPLGLALVLWTVLGPC                | 16                |
| Человеческий контактин 1 (CNTN1)  | VSQVKIS <b>G</b> APTLSPSLLGLLLPAFGILVYLEF               | 17                |
| Изоформа A3 человеческого эфрина (EFNA3)                                      | QVPKLEKS <b>S</b> GTSPKREHLPLAVGIAFFLMTFLAS             | 18                |
| Изоформа A2 человеческого эфрина (EFNA2)                                      | EAP <b>E</b> PIFTS <b>N</b> NSCSPGGCRLFLSTIPVLWTLGS     | 19                |
| CD24  | TNATTKAA <b>G</b> GALQSTASLFVVSLSLHLYS                  | 20                |

\*см., например, Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): ColdSpring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. doi: 10.1101/glycobiology.3e.012 and Galian et al., “Efficient Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Modification of Membrane Proteins Requires a C-Terminal Anchoring Signal of Marginal Hydrophobicity,” *J. Biol. Chem.* 287(20):16399-16409 (2012), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки; \*\*выделенная жирным шрифтом аминокислота представляет собой сайт присоединения GPI (последовательность справа от этого места отщепляется от белка при добавлении анкера).

**[0031]** В любом варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность рекомбинантного конструкта кодирует последовательность

присоединения GPI, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20.

**[0032]** Другие известные человеческие белки с доменом GPI-анкера, из которых может быть получена последовательность присоединения GPI, включают, без ограничений, меланотрансферрин, CD109, предшественник кадгерина 13 изоформы 1, предшественник подобного рецептору ретикулона 4 белка 1, предшественник карбоангидразы 4, предшественник изоформы 1 нейротримина, предшественник изоформы 2 мезотелина, предшественник изоформы 1 антигена CD48, предшественник ассоциированного с мембраной акросомы сперматозоида белка 4, предшественник изоформы 1 человеческого индуцирующего реверсию богатого цистеином белка с мотивами Kazal, предшественник родственной карциноэмбриональному антигену молекуле 8 клеточной адгезии, предпротеин связывающего U16 белка 2, изоформа ассоциированного с лимфоцитарной функцией антигена 3, человеческий рецептор-ловушка, предшественник карбоксипептидазы M, предшественник изоформы экто-АДФ-рибозил-трансферазы 3, предшественник изоформы b рецептора альфа-4 семейства GDNF, предпротеин рецептора альфа-3 семейства GDNF, предшественник изоформы 1 сердцевинного белка бревикана, предпротеин изоформы 1 семафорина-7A, предшественник антигена CD177, предшественник гликопротеина олигоцитарного миелина, предшественник антигена CD160 и предшественник интерлектина-1 (см., например, публикацию Pierleoni et al., "R -PredGPI: A GPI Anchor Predictor," *BMC Bioinformatics* 9:392 (2008), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Соответственно, вторая нуклеотидная последовательность рекомбинантного конструкта, описанного в настоящем документе, может кодировать последовательность присоединения GPI, полученную из любого из вышеупомянутых белков с доменом GPI-анкера.

**[0033]** В любом варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, кодирует последовательность присоединения GPI, производную от щелочной фосфатазы. В любом варианте осуществления вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, кодирует последовательность присоединения

GPI, производную от щелочной фосфатазы человека, например плацентарной щелочной фосфатазы, щелочной фосфатазы зародышевой клетки, щелочной фосфатазы кишечного типа или тканенеспецифической щелочной фосфатазы.

**[0034]** В любом варианте осуществления вторая нуклеотидная

5 последовательность рекомбинантного конструкта кодирует последовательность присоединения GPI плацентарной щелочной фосфатазы человека, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 или ее

10 фрагментом.

**TTDAАНPGRSVVPALLPLLAGTLLLLLETATAP (SEQ ID NO: 5).**

**[0035]** В любом варианте осуществления вторая нуклеотидная

последовательность рекомбинантного конструкта кодирует последовательность присоединения GPI из плацентарной щелочной фосфатазы человека SEQ ID NO: 5 или

15 ее фрагмент.

**[0036]** В любом варианте осуществления нуклеотидная последовательность,

кодирующая последовательность присоединения GPI, получена из плацентарной щелочной фосфатазы человека. Например, последовательность присоединения GPI может быть получена из плацентарной щелочной фосфатазы человека (см., например,

20 номера доступа GenBank AAA51706.1, AAA51708.1 или AAA51709.1). В любом варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI плацентарной щелочной фосфатазы человека, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

25 более идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

**ACCACTGATGCTGCCATCCTGGAAGGTCTGTGGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTGCTGGCTGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACTGCCACTGCTCCC (SEQ ID NO: 2)**

**[0037]** В любом варианте осуществления первая и вторая нуклеотидные

последовательности конструкта кодируют слитный белок калликреина-2, содержащий

30 аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, показанной ниже:

**MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLV**

HPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRVPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSL  
 RPDEDESSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLRPRS  
 LQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCCGGDSGGPLVCNGVLQG  
 ITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDAAHPGRSVVPALLPLL

5 **AGTLLLLLETATAP** (сигнальная последовательность KLK2 показана двойным  
 подчеркиванием; последовательность присоединения PLAP GPI показана жирным  
 шрифтом; сайт расщепления показан жирным шрифтом и подчеркиванием). В любом  
 варианте осуществления первая и вторая нуклеотидные последовательности конструктора  
 кодируют слитный белок калликреина-2, содержащий аминокислотную  
 10 последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной  
 последовательности SEQ ID NO: 6. В любом варианте осуществления первая и вторая  
 нуклеотидные последовательности конструктора кодируют аминокислотную  
 последовательность SEQ ID NO: 6.

**[0038]** В любом варианте осуществления первая и вторая нуклеотидные  
 15 последовательности рекомбинантного нуклеотидного конструктора содержат  
 нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%,  
 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%  
 или более идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3, показанной  
 ниже:

20 ATGTGGGACCTGGTTCTCTCCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCCTGGTGCCGTGCC  
 CCTCATCCAGTCTCGGATCGTGGGGGGCTGGGAGTGCGAGAAGCACAGCCAGCC  
 TTGGCAAGTGGCAGTGTACTCCCACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTG  
 CACCCACAATGGGTGCTCACCGCGGCCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCT  
 GGCTGGGACGCCATAACCTGTTCTGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGT  
 25 GTCCCATTCCTTCCCTCACCCATTGTACAACATGTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTT  
 TGAGGCCTGATGAGGACAGCTCCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACC  
 CGCAAAGATTACCGACGTCGTGAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGC  
 CTTGGGGACTACCTGTTATGCTTCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTC  
 CTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGTGCGTGTCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGT  
 30 GCGCCAGAGCCTACTCCGAAAAGGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTG  
 GACCGGGGGAAAGGACACTTGCGGCGGAGACAGCGGCGGCCCCCTGGTCTGCAA  
 CGGCGTGCTGCAGGGAATTACCTCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAA  
 AAGCCCGCCGTGTACACTAAGGTCGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACC  
 ATCGCCGCGAACCCGGAATTCACCACTGATGCTGCCCATCCTGGAAGGTCTGT

**GGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTGCTGGCTGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACT  
GCCACTGCTCCCTAATGA** (последовательность, кодирующая сигнальную

последовательность KLK2, показана двойным подчеркиванием; последовательность,

кодирующая последовательность присоединения PLAP GPI, показана жирным

5 шрифтом; стоп-кодона показаны курсивом). В любом варианте осуществления

рекомбинантный нуклеотидный конструкт содержит нуклеотидную

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3. В любом

варианте осуществления рекомбинантный нуклеотидный конструкт содержит

10 нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

**[0039]** Рекомбинантный нуклеотидный конструкт по описанию представляет

собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую комбинацию двух или более

генетических элементов, не встречающихся в природе вместе. Каждый

рекомбинантный нуклеотидный конструкт может содержать не встречающуюся в

15 природе нуклеотидную последовательность, которая может находиться в форме

линейной ДНК, кольцевой ДНК, т. е. помещаться в вектор (например, бактериальный

вектор, вирусный вектор, плазмидный вектор) или интегрироваться в геном. Таким

образом, нуклеотидные конструкты по настоящему описанию могут дополнительно

содержать нуклеотидную последовательность промотора, расположенную с 5' стороны

20 от нуклеотидной последовательности, кодирующей KLK2. Промотор представляет

собой последовательность ДНК, которая содержит сайт связывания РНК-полимеразы и

инициирует транскрипцию расположенной далее последовательности нуклеиновой

кислоты. Таким образом, в любом варианте осуществления, описанные в настоящем

документе нуклеотидные конструкты содержат нуклеотидную последовательность

25 промотора.

**[0040]** Промотор может представлять собой постоянно активный промотор (т. е.

промотор, который постоянно находится в активном или «включенном» состоянии),

индуцибельный промотор (т. е. промотор, состояние которого, активное или

неактивное, контролируется внешним стимулом, например наличием конкретной

30 температуры, соединения или белка), пространственно ограниченный промотор (т. е.

элемент контроля транскрипции, энхансер и т. д.) (например, тканеспецифический

промотор, специфичный для конкретного типа клеток промотор и т. д.) или промотор с

временным ограничением (т. е. промотор находится во «включенном» или

«выключенном» состоянии на конкретных стадиях биологического процесса).

**[0041]** Приемлемые промоторы могут быть получены из вирусов и, следовательно, могут называться вирусными промоторами, или они могут быть получены из любого организма, включая прокариотические или эукариотические организмы. Приемлемые промоторы можно использовать для обеспечения экспрессии с помощью любой РНК-полимеразы (например, РНК-полимеразы I, РНК-полимеразы II, РНК-полимеразы III). Промотор может представлять собой вирусный промотор.

Примеры промоторов включают, без ограничений, ранний промотор SV40, повтор с длинными концевыми повторами (LTR) вируса опухоли молочной железы мыши; главный поздний промотор аденовируса (Ad MLP); промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как немедленная ранняя промоторная область CMV (CMVIE), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), малый ядерный промотор U6 человека (U6) (публикация Miyagishi et al., "U6 Promoter-Driven siRNAs with Four Uridine 3' Overhangs Efficiently Suppress Targeted Gene Expression in Mammalian Cells," *Nat. Biotechnol.* 20:497–500 (2002), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), улучшенный промотор U6 (например, публикация Xia et al., "An Enhanced U6 Promoter for Synthesis of Short Hairpin RNA," *Nucleic Acids Res.* 31(17):e100 (2003), которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки), человеческий промотор H1 (H1) и т. п. В любом варианте осуществления промотор представляет собой фаговый промотор, например промотор T7, который был сконструирован для экспрессии в клетке млекопитающего.

**[0042]** В любом варианте осуществления промотор представляет собой промотор эукариотической РНК-полимеразы или его производное. Иллюстративные промоторы РНК-полимеразы II включают, без ограничений, промоторы цитомегаловируса («CMV»), фосфоглицераткиназы-1 («PGK-1») и фактора удлинения 1 $\alpha$  («EF1 $\alpha$ »). В еще одном варианте осуществления промотор представляет собой промотор эукариотической РНК-полимеразы III, выбранный из группы, состоящей из U6, H1, 56, 7SK и их производных.

**[0043]** Промотор РНК-полимеразы может быть получен от млекопитающих. Приемлемые промоторы млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают, помимо прочего, промоторы человека, мыши, быка, собаки, кошки, овцы, свиньи, медведя и обезьяны.

**[0044]** В любом варианте осуществления нуклеотидная последовательность промотора представляет собой нуклеотидную последовательность промотора фактора удлинения 1 альфа (EF1 $\alpha$ ). Пример нуклеотидной последовательности промотора Ef1 $\alpha$

представлен в SEQ ID NO: 21 ниже. Альтернативные приемлемые нуклеотидные последовательности промотора представлены в таблице 2 ниже.

**Таблица 2. Примеры нуклеотидных последовательностей промотора**

| Промотор | Последовательность  | SEQ ID NO: |
|----------|---|------------|
| EF1a     | GGCTCCGGTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTC<br>CCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTA<br>GAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGATGTCGTGTA<br>GGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTG<br>CAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCA<br>GAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCT<br>TTACGGGTTATGGCCCTTGCCTTGAATTAATTCACCTGGCT<br>GCAGTACGTGATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTG<br>GGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGC<br>TTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGCTGCGAAT<br>CTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTA<br>GCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGC<br>AAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT<br>CGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGACGGGGCCCGTGCCTCCAGC<br>GCACATGTTCCGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGA<br>ATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT<br>GGTCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTG<br>GCCCCGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCC<br>GGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGG<br>AGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTC<br>CGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGC<br>CGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC<br>TTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACAC<br>TGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA<br>ATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTC<br>TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGT<br>GTCGTGA | 21         |
| CMV      | TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC<br>ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC<br>TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGAC<br>GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA<br>ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA<br>AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG<br>TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA<br>CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC<br>ATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG<br>TTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAAT<br>GGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT<br>CGTAAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA<br>CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAG<br>ATC   | 22         |
| CAGG     | ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC<br>CCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG<br>CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATG<br>ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT<br>CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT<br>CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC<br>GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG<br>GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA<br>CCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTC<br>CCCCCCTCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTAT<br>TTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCA<br>GGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGA   | 23         |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
|             | <p>GAGGTGCGGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCGCTCCGAAAGTT<br/> CCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAAAGCG<br/> AAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCC<br/> CGTGCCCCGCTCCGCCGCCCTCGCGCCCGCCCGCCCGGCTCTG<br/> ACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTC<br/> TCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTTGTTC<br/> TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCT<br/> TTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC<br/> GTGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGA<br/> GCGCTGCGGGCGCGGGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAAGTGTGCG<br/> CGAGGGGAGCGCGGGCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGG<br/> GCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGG<br/> GGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCCCC<br/> CCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGG<br/> TGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGG<br/> GCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCG<br/> CCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCCCG<br/> GAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGACCCATTGCC<br/> TTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCC<br/> AAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCCCT<br/> CTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAA<br/> ATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCGCTCCCTT<br/> CTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTT<br/> CGGGGGGACGGGCGAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGAC<br/> CGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTT<br/> TTCCTACAGTCTCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATC<br/> ATTTTGGCAAAGAATTC</p> |           |
| <p>PGK1</p> | <p>TTCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCA<br/> TGCCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACCTTGGCGCTACACAAGTGGC<br/> CTTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCG<br/> GCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCC<br/> TAGTCAGGAAGTTCACCCCGCCCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGA<br/> CGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTACTAGTCTCGTGCAGATGG<br/> ACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGC<br/> GGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTG<br/> GGAAGGGGTGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGG<br/> CGGGGCGGGCGCCGAAGGTCCTCCGAGGCCCAGCATTCTGCA<br/> CGCTTCAAAGCGCACGTCTGCCGCGCTGTTCTCCTCTTCTCATC<br/> TCCGGGCCTTTCGACCT</p>  | <p>24</p> |
| <p>SV40</p> | <p>CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCC<br/> CCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC<br/> AACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA<br/> TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCC<br/> TAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTC<br/> TCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG<br/> GCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTT<br/> TTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT</p>  | <p>25</p> |
| <p>UBC</p>  | <p>GGTGCAGCGGCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGC<br/> CCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCA<br/> GGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCGACGCTCAGGACAGCGGCC<br/> GCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGG<br/> ACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCT<br/> TTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGC<br/> GATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTA<br/> TATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCGGTCGCAGCCG<br/> GGATTTGGGTGCGGTTCTTGTGGTGGATCGCTGTGATCGTCACT<br/> TGGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCG<br/> CGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCCCAAGG<br/> GCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTT<br/> GGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGG</p>   | <p>26</p> |

|  |  |  |
|--|--|--|
|  | AAGACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGG<br>GGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGGCCTTCGC<br>TAATGCGGGAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCA<br>TCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGG<br>GTTTGTCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTGG<br>GCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCTCGTCGTGTCGTG<br>ACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTG<br>CCGGTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGT<br>TCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTC<br>TGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGTT<br>TTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAAC<br>TGCCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCACC<br>TTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAG<br>ACTAGTAAA |  |
|--|--|--|

**[0045]** Некоторые варианты осуществления настоящего описания относятся к вектору, содержащему рекомбинантный нуклеотидный конструкт, описанный в настоящем документе (т. е. рекомбинантный нуклеотидный конструкт, кодирующий слитный белок калликреина-2, причем указанный конструкт содержит: нуклеотидную последовательность, кодирующую калликреин-2 (KLK2), и нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), при этом указанная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, расположена с 3' стороны от кодирующей KLK2 нуклеотидной последовательности). Используемый в настоящем документе термин «вектор» означает любой генетический элемент, такой как плаزمид, фаг, транспозон, космида, хромосома, вирус, вирион и т. д., которые способны к репликации при ассоциации с надлежащими элементами контроля, и которые способны передавать генные последовательности между клетками. Таким образом, термин включает клонирующие и экспрессионные векторы, а также вирусные векторы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантный нуклеотидный конструкт может быть вставлен в систему экспрессии или вектор в правильной смысловой (5'–3') ориентации и корректировать рамку считывания. Вектор может содержать необходимые элементы для транскрипции и/или трансляции слитного белка калликреина-2, как описано в настоящем документе.

**[0046]** В одном варианте осуществления вектор представляет собой плазмиду. Многочисленные векторы, приемлемые для того, чтобы содержать рекомбинантный нуклеотидный конструкт, описанный в настоящем документе, известны специалистам в данной области, и многие из них доступны в продаже. Следующие векторы представлены в качестве примера; для эукариотических клеток: pcDNA3.1(+), Tornado (публикация Litke & Jaffrey, “Highly Efficient Expression of Circular RNA Aptamers in

Cells Using Autocatalytic Transcripts,” *Nat. Biotechnol.* 37(6):667–675(2019), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG и pSVLSV40 (Pharmacia). Однако можно использовать любой другой вектор при условии, что он совместим с клеткой.

5 [0047] В другом варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. Вирусный вектор может быть выбран из любого вектора, приемлемого для введения рекомбинантного нуклеотидного конструкта, описанного в настоящем документе, в клетку любым способом, для облегчения экспрессии рекомбинантного нуклеотидного конструкта. Приемлемые вирусные векторы включают, без  
10 ограничений, вирусные векторы на основании вируса осповакцины; полиовируса; аденовирус (см., например, опубликованные патентные заявки РСТ № WO 94/12649, принадлежащая Gregory et al., WO 93/03769, принадлежащая Crystal et al., WO 93/19191, принадлежащая Haddada et al., WO 94/28938, принадлежащая Wilson et al., WO 95/11984, принадлежащая Gregory, и WO 95/00655, принадлежащая Graham,  
15 которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме); аденоассоциированный вирус (см., например, публикации Flannery et al., “Efficient Photoreceptor-Targeted Gene Expression *In Vivo* by Recombinant Adeno-Associated Virus,” *PNAS* 94:6916–6921 (1997); Bennett et al., “Real-Time, Noninvasive *In Vivo* Assessment of Adeno-Associated Virus-Mediated Retinal Transduction,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*  
20 38:2857-2863 (1997); Jomary et al., “Nonviral Ocular Gene Transfer,” *Gene Ther.* 4:683–690 (1997); Rolling et al., “Evaluation of Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer into the Rat Retina by Clinical Fluorescence Photography,” *Hum. Gene Ther.* 10:641–648 (1999); Ali et al., “Gene Transfer Into the Mouse Retina Mediated by an Adeno-Associated Viral Vector,” *Hum. Mol. Genet.* 5:591–594 (1996); Samulski et al., “Helper-Free Stocks of  
25 Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does not Require Viral Gene Expression,” *J. Vir.* 63:3822–3828 (1989); Mendelson et al., “Expression and Rescue of a Nonselected Marker from an Integrated AAV Vector,” *Virology* 166:154–165 (1988); и Flotte et al., “Stable *In Vivo* Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator With an Adeno-Associated Virus Vector,” *PNAS* 90:10613–10617 (1993), которые  
30 полностью включены в настоящий документ путем ссылки); SV40; вирус простого герпеса; вирус иммунодефицита человека (см., например, публикацию Miyoshi et al., “Stable and Efficient Gene Transfer into the Retina Using an HIV-Based Lentiviral Vector,” *PNAS* 94:10319–10323 (1997), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки); ретровирусный вектор, например вирус лейкоза мыши, вирус

некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус птичьего лейкоза, лентивирус, вирус иммунодефицита человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы и т. п. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора, лентивирусного вектора, вакцинного вектора, ретровирусного вектора и вирусного вектора простого герпеса.

**[0048]** Иллюстративный вирусный вектор, содержащий рекомбинантный конструктор KLK2-GPI, имеет последовательность SEQ ID NO: 7, показанную ниже:

10 ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTT  
 AGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAG  
 TAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGAT  
 TGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCT  
 CGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG  
 15 GCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCA  
 AGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCT  
 TTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCG  
 AAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGC  
 ACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTTGACTAGCGG  
 20 AGGCTAGAGGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAA  
 TAAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATA  
 AATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATC  
 CTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAAC  
 CATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGA ACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAAC  
 25 CCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGA  
 CAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCA  
 CTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA  
 TATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCA  
 AAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTC  
 30 CTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG  
 ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGC  
 TGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA  
 GCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCT  
 CCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAA ACTCATTTCACCACTGCTGTGCCTTGG

AATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGA  
TGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGA  
AGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAA  
ATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAA  
5 TTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTGTACT  
TTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCAC  
CTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG  
AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCG  
GTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAT  
10 AGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGAATTACAAAAACAAATTAC  
AAAATTCAAATTTTTTCGATACTAGTGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAG  
TGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGGC  
AATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTC  
GTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAG  
15 TAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAA  
GCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGC  
CATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAAC  
TGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCG  
GCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCT  
20 GCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAA  
GCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAGCCGCCACCATGTGGGACCTGGTTCTCTCCA  
TCGCCTTGTCTGTGGGGTGC ACTGGTGCCGTGCCCTCATCCAGTCTCGGATCGTG  
GGGGGCTGGGAGTGCGAGAAGCACAGCCAGCCTTGGCAAGTGGCAGTGTACTCC  
CACGGTTGGGCGCACTGCGGTGGCGTGCTGGTGCACCCACAATGGGTGCTCACCG  
25 CGGCCCACTGTCTGAAGAAGAATTCACAAGTCTGGCTGGGACGCCATAACCTGTT  
CGAACCTGAAGATACTGGGCAGCGCGTGCCGGTGTCCATTCCCTCCCTCACCCA  
TTGTACAACATGTCGCTGCTGAAGCACCAGTCTTTGAGGCCTGATGAGGACAGCT  
CCCATGACCTCATGCTGCTTAGACTCTCGGAACCCGCAAAGATTACCGACGTCGT  
GAAAGTGCTTGGACTGCCGACGCAGGAACCCGCCTTGGGGACTACCTGTTATGCT  
30 TCCGGCTGGGGATCCATCGAGCCCGAAGAATTCCTGCGGCCGCGCAGCCTGCAGT  
GCGTGTCCCTCCATCTGCTGTCAAACGATATGTGCGCCAGAGCCTACTCCGAAAA  
GGTCACCGAGTTTATGCTGTGCGCCGGACTGTGGACCGGGGGAAAGGACACTTGC  
GGCGGAGACAGCGGGCGGCCCCCTGGTCTGCAACGGCGTGCTGCAGGGAATTACC  
TCGTGGGGTCCAGAGCCGTGTGCGCTGCCTGAAAAGCCCGCCGTGTACTACTAAGG

TCGTGCACTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGCCGCGAACCCGGAATTCA  
CCACTGATGCTGCCATCCTGGAAGGTCTGTGGTGCCTGCCTTGCTGCCTCTGCTG  
GCTGGCACTCTGCTGCTGCTGGAGACTGCCACTGCTCCCTAATGAGGATCCGCGG  
CCGCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATA  
5 AGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCA  
ATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCT  
TTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTT  
CCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGC  
GGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAG  
10 ATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGT  
GGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGC  
CCAGAAGGTACCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTT  
ACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGAC  
GTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGCGTCCGGA  
15 ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGC  
TATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTT  
CCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGT  
GCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCGCGACG  
GGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGC  
20 TGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCC  
GAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGG  
CTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCG  
GATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCT  
CGCGCCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGA  
25 TCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGC  
CGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGG  
ACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGA  
CCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCT  
ATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGACTCGACAATCAACCTCTGGATTACA  
30 AAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGT  
GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATT  
TTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT  
GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTT  
GGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT

ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTC  
GGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCCT  
TGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGT  
CCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGC  
5 GGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC  
GCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTT  
AGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGA  
AGATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC  
CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTG  
10 CCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAG  
ATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTC  
ATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAG  
GAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAAT  
TTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT  
15 CAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCC  
GCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT  
TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG  
AGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGCAGAGACCAAATTCGTAATCATGTC  
ATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAG  
20 CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATT  
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG  
CATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGTTTTCGTATTGGGCGCTCTT  
CCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGT  
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC  
25 AGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGG  
CCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAA  
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGC  
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCG  
GATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGC  
30 TGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG  
AACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC  
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT  
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT  
ACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC

CTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC  
GGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG  
AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACG  
TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAA  
5 ATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGA  
CAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT  
CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT  
ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA  
GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCT  
10 GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA  
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG  
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG  
GCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCT  
CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAG  
15 CACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT  
GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT  
GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT  
CATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG  
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCAACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTAC  
20 TTTACACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAA  
GGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT  
TATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT  
TTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCT  
GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCA  
25 CGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACAT  
GCAGTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACA  
AGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTAT  
GCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCG  
CACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTG  
30 CGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGG  
CGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCC  
AGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG (вектор pCDH Neo,  
кодирующий huKLK2\_GPI; SEQ ID NO: 7).

**[0049]** Другой аспект настоящего описания относится к слитному белку калликреина-2, кодируемому рекомбинантным нуклеотидным конструктом, как описано в настоящем документе, или вектором, содержащим рекомбинантный нуклеотидный конструкт в соответствии с настоящим описанием.

5 **[0050]** Таким образом, в любом варианте осуществления слитный белок калликреина-2 в соответствии с настоящим описанием содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID  
10 NO: 6, показанной ниже:

MWDLVLSIALSVGCTGAVPLIQSRIVGGWECEKHSQPWQVAVYSHGWAHCGGVLV  
HPQWVLTAAHCLKKNSQVWLGRHNLFEPEDTGQRPVSHSFPHPLYNMSLLKHQSL  
RPDEDSSHDLMLLRLSEPAKITDVVKVLGLPTQEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLRPRS  
LQCVSLHLLSNDMCARAYSEKVTEFMLCAGLWTGGKDTCGGDSGGPLVCNGVLQG  
15 ITSWGPEPCALPEKPAVYTKVVHYRKWIKDTIAANPEFTTDAANPGRSVVPALLPLL

**AGTLLLLLETATAP** (сигнальная последовательность **KLK2** показана двойным подчеркиванием; последовательность присоединения **PLAP GPI** показана жирным шрифтом; сайт расщепления показан жирным шрифтом и подчеркиванием). В любом варианте осуществления слитный белок калликреина-2, описанный в настоящем  
20 документе, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В любом варианте осуществления слитный белок калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[0051]** Как описано *выше*, последовательность присоединения  
25 гликозилфосфатидилинозитола (GPI) содержит участок гидрофобных аминокислот, которые посттрансляционно расщепляются и заменяются, посредством реакции трансформации, на GPI-анкер (см., например, Kinoshita, T., "Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series," *J. Lipid Res.* 57(1):4–5 (2016), которая полностью включена в настоящий документ путем  
30 ссылки). Таким образом, в любом варианте осуществления последовательность присоединения GPI, описанная в настоящем документе, содержит сайт расщепления. В соответствии с такими вариантами осуществления слитный белок калликреина-2 в соответствии с настоящим описанием не содержит аминокислотных остатков после сайта расщепления. Например, в некоторых вариантах осуществления слитный белок

калликреина-2 при экспрессии *in vivo* не содержит аминокислотных остатков 267–295 из SEQ ID NO: 6.

**[0052]** В любом варианте осуществления слитный белок калликреина по настоящему описанию не содержит amino-концевой сигнальной последовательности в калликреиновом участке слитного белка. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитный белок калликреина не содержит аминокислотных остатков 1–17 из SEQ ID NO: 6.

**[0053]** В любом варианте осуществления слитный белок калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. Например, слитный белок калликреина-2 может иметь аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления слитный белок калликреина-2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

**[0054]** Другой аспект настоящего описания относится к препаратам клеток, причем клетки препарата модифицированы для экспрессии рекомбинантного слитного конструкта калликреина-2, описанного в настоящем документе. Клетки препарата модифицированы для экспрессии на своей поверхности рекомбинантного слитного белка калликреина-2, причем слитный белок калликреина-2 включает полипептидную последовательность калликреина-2, участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозита (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2, и домен GPI-анкера, соединенный с участком последовательности присоединения GPI.

**[0055]** Как подробно описано *выше*, участок слитного белка калликреина-2 может включать любую полипептидную последовательность калликреина-2 млекопитающих, например человеческую, мышиную, бычью, собачью, кошачью, овечью, свиную, медвежью или обезьянью полипептидную последовательность калликреина-2. В любом варианте осуществления относящаяся к калликреину-2 участок слитного белка содержит человеческий белок калликреин-2 или его полипептидный фрагмент. Например, полипептидная последовательность человеческого калликреина-2 может иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% или более идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или аминокислотными остатками 18–263 SEQ ID NO: 4.

**[0056]** Участок последовательности присоединения GPI может быть производным от последовательности присоединения GPI известного белка с доменом GPI-анкера. Примеры белков с доменом GPI-анкера и последовательностей присоединения GPI представлены *выше*. В любом варианте осуществления участок последовательности присоединения GPI получен из щелочной фосфатазы, например плацентарной щелочной фосфатазы человека.

**[0057]** В любом варианте осуществления участок последовательности присоединения GPI представляет собой участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5. В любом варианте осуществления участок последовательности присоединения GPI слитного белка калликреина-2, как описано в настоящем документе, содержит аминокислотные остатки 1–3 из SEQ ID NO: 5.

**[0058]** В любом варианте осуществления клетки препарата модифицируют для экспрессии рекомбинантного слитного белка калликреина-2 с аминокислотной последовательностью, имеющей по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. Например, клетки препарата могут экспрессировать на своей поверхности слитный белок калликреина-2, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 или последовательностью SEQ ID NO: 7.

**[0059]** В других вариантах осуществления клетки препарата экспрессируют на своей поверхности рекомбинантный слитный белок калликреина-2, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, или модифицированы им.

**[0060]** Слитный белок калликреина-2 дополнительно содержит домен GPI-анкера. Домен GPI-анкера связан с последовательностью присоединения GPI посредством трансамидазной реакции с GPI, которую проводят *in vivo* посттрансляционно.

Присоединенный домен GPI-анкера содержит сердцевинную гликановую структуру этаноламин-PO-6Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man $\alpha$ 1-4GlcNa1-6*мио*-инозит-1-PO-липида.

**[0061]** Как отмечено *выше*, клетки препарата могут экспрессировать слитный белок калликреина-2 с рекомбинантного нуклеотидного конструкта (например, линейного конструкта) по настоящему описанию, или с вектора, содержащего рекомбинантный нуклеотидный конструкт по настоящему описанию.

**[0062]** Рекомбинантные нуклеотидные конструкты и/или векторы, описанные в настоящем документе, могут быть введены в клетки путем трансформации, в частности трансдукции, конъюгации, липофекции, слияния с протопластом, мобилизации, бомбардировки частицами, микроинъекции, трансфекции или электропорации. В любом варианте осуществления клетки препарата стабильно трансдуцированы нуклеотидным конструктом по настоящему описанию или вектором по настоящему описанию. В любом варианте осуществления клетки препарата содержат рекомбинантный нуклеотидный конструкт, стабильно встроенный в их геном.

**[0063]** В любом варианте осуществления клетки препарата представляют собой клетки млекопитающих. Приемлемые клетки млекопитающих включают, без ограничений, клетки грызуна (т. е. клетки мыши или крысы), клетки кролика, клетки морской свинки, клетки кошки, клетки собаки, клетки свиньи, клетки лошади, клетки коровы, клетки овцы, клетки обезьяны, клетки примата, не являющегося человеком, или клетки человека. В любом варианте осуществления клетки препарата представляют собой клетки человека.

**[0064]** Приемлемые препараты клеток, содержащих рекомбинантные нуклеотидные конструкты или векторы, описанные в настоящем документе, включают первичные, иммортализованные или трансформированные эмбриональные клетки, клетки плода или зрелые клетки на любой стадии их линии, например тотипотентные, плюрипотентные, мультипотентные или дифференцированные клетки.

Дополнительные приемлемые препараты клеток включают клетки из линии клеток.

**[0065]** В любом варианте осуществления клетки препарата представляют собой клетки предстательной железы, например первичные клетки предстательной железы, первичные клетки рака предстательной железы, линии клеток рака предстательной железы или линии неопухолевых клеток предстательной железы.

**[0066]** Приемлемые примеры линий неопухолевых клеток предстательной железы включают, без ограничений, линии клеток RNS-1-1, RWPE-1, BPH1 и PIN (публикация Cunningham & You, "In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer

Research,” *J. Biol. Methods* 2(1):e17 (2015), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Клетки RWPE-1 immortalizovali вирусом папилломы человека (HPV) 18 с последующим выделением и размножением в течение 6–7 недель, и они были положительными по мРНК/белку AR/PSA и чувствительны к андрогенам.

5 Клетки VPH1 выделяли из тканей доброкачественной гипертрофии или гиперплазии (ВРН) предстательной железы, полученных посредством трансуретральной резекции от пациента, проходящего операцию по поводу обструкции мочевыводящих путей из-за ВРН. Клетки VPH1 immortalizovali с помощью большого Т-антигена SV40 и они представляли собой AR/PSA-отрицательные и WT p53-положительные клетки. Клетки  
10 PIN выделяли у пациента с интраэпителиальной неоплазией предстательной железы (PIN) и immortalizovali с помощью HPV 18.

**[0067]** В любом варианте осуществления клетки предстательной железы представляют собой не имеющие предшествующей гормональной терапии линии клеток рака предстательной железы (PCa) предстательной железы. Приемлемые не  
15 имеющие предшествующей гормональной терапии линии клеток PCa включают, без ограничений, RWPE-2, LNCaP, LAPC-4, LAPC-9, VCaP, MDA PCa 2a/2b и LuCaP (публикация Cunningham & You, “In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research,” *J. Biol. Methods* 2(1):e17 (2015), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Сначала клетки LNCaP выделяли из  
20 метастатической аденокарциномы предстательной железы человека, обнаруженной в лимфатическом узле и реагирующей на андроген экспрессией белков/мРНК AR и PSA. Клетки VCaP впервые выделили в 2001 году из метастатического поражения позвоночника. Клетки VCaP являются положительными в отношении чувствительности к андрогенам, имеют белок/мРНК AR дикого типа и экспрессируют мРНК/белок PSA,  
25 простатическую кислую фосфатазу (PAP), белок ретинобластомы (Rb) и p53 (с мутацией A248W). Линии клеток MDA PCa 2a/2b были получены от одного пациента с метастазами в позвоночнике во время поздней стадии заболевания, являются чувствительными к андрогенам и туморогенными у мышей, экспрессируют мРНК/белок AR и экспрессируют мРНК/белок PSA.

30 **[0068]** В любом варианте осуществления линии клеток рака предстательной железы представляют собой кастрационно-резистентные линии клеток. Приемлемые кастрационно-резистентные линии клеток включают, без ограничений, линии клеток C4-2, C4-2B, 22Rv1, ARCaP (MDA PCa 1), PC3 и DU145 (Cunningham & You, “In Vitro and In Vivo Model Systems Used in Prostate Cancer Research,” *J. Biol. Methods* 2(1):e17

(2015), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Клетки PC3 были выделены из метастазировавшей в позвоночник опухоли предстательной железы, они являются гормонально-независимыми, не экспрессируют андрогенный рецептор (AR) или мРНК/белок PSA и экспрессируют аномальный белок p53 с делецией C в кодоне 138, с получением в результате несмыслового кодона в позиции 169 (вызывая потерю гетерозиготности). Клетки DU145 получены из метастазов головного мозга, независимо от гормонов, не экспрессируют андрогенный рецептор (AR) мРНК/белок или мРНК/белок PSA и содержат гетерозиготный паттерн экспрессии P223L/V274F p53.

10 **[0069]** В любом варианте осуществления клетки препарата не экспрессируют эндогенный KLK2, т. е. клетки экспрессируют только слитный белок калликреина-2, описанный в настоящем документе. В любом варианте осуществления клетки препарата экспрессируют эндогенный KLK2 и экспрессируют слитный белок калликреина-2, описанный в настоящем документе.

15 **[0070]** Дополнительный аспект настоящего описания относится к животному, не являющегося человеком, содержащему клетки, которые экспрессируют на своей поверхности рекомбинантный слитный белок калликреина-2, причем рекомбинантный слитный белок включает полипептидную последовательность калликреина-2, участок последовательности присоединения гликозилфосфатидинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2, и домен GPI-анкера, соединенный с участком присоединения GPI.

20 **[0071]** В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный слитный белок калликреина-2, трансплантируют животному, не являющемуся человеком. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный слитный белок калликреина-2, трансплантируют грызуну. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие рекомбинантный слитный белок калликреина-2, трансплантируют мышам. В одном варианте осуществления клетки человека, экспрессирующие рекомбинантный слитный белок калликреина-2, трансплантируют грызуну с ослабленным иммунитетом, например мышам с ослабленным иммунитетом. В одном варианте осуществления клетки мыши, экспрессирующие рекомбинантный слитный белок калликреина-2, трансплантируют сингенной мышам.

30 **[0072]** В другом варианте осуществления рекомбинантный нуклеотидный конструктор, кодирующий слитный белок калликреина-2, стабильно интегрирован в

геном животного, не являющегося человеком, с получением трансгенного животного, не являющегося человеком, способного экспрессировать слитный белок калликреина-2 на поверхности всех клеток или определенных подтипов клеток, как описано в настоящем документе.

5 **[0073]** Рекомбинантный нуклеотидный конструкт, кодирующий слитный белок калликреина-2, описанный *выше*, можно интегрировать в геном животного, не являющегося человеком, с помощью любого стандартного способа, хорошо известного специалистам в данной области. Для введения трансгена животному и получения основателя линии трансгенных животных можно использовать любую из множества  
10 методик, известных в данной области техники (см., например, Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1986); Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1994) и патенты США № 5,602,299, принадлежащий Lazzarini; 5,175,384, принадлежащий Krimpenfort; 6,066,778, принадлежащий Ginsburg; и 6,037,521,  
15 принадлежащий Sato et al, причем содержание каждой из них полностью включено в настоящий документ путем ссылки). Такие методики включают, без ограничений, доядерную микроинъекцию (патент США № 4,873,191, принадлежащий Wagner et al, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки); ретровирус-опосредованный перенос генов в зародышевые линии (публикация Van der Putten et al,  
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6148–6152 (1985), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки); нацеливание на ген в эмбриональных стволовых клетках (публикация Thompson et al., *Cell* 56:313–321 (1989), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки); электропорация эмбрионов (Lo et al., *Mol. Cell. Biol.* 3:1803–1814 (1983), которая полностью включена в настоящий  
25 документ путем ссылки); и опосредованный сперматозоидами перенос генов (Lavitrano et al., *Cell* 57:717–723 (1989), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

**[0074]** В любом варианте осуществления для введения трансгенов для получения трансгенных животных можно использовать эмбриональные клетки на различных  
30 стадиях развития. В зависимости от стадии развития эмбриональной клетки используются различные способы. Зигота является хорошей мишенью для микроинъекции, и способы микроинъекции в зиготы хорошо известны (см. патент США № 4,873,191, принадлежащий Wagner et al., который полностью включен в настоящий документ путем ссылки). Большим преимуществом применения зигот в

качестве мишени для переноса генов является то, что в большинстве случаев инъекцированная ДНК будет включена в геном хозяина до первого деления (Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438–4442 (1985), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Как следствие, все клетки трансгенного животного, не являющегося человеком, будут нести встроенный трансген.

**[0075]** Трансгенные животные настоящего изобретения могут также быть получены путем введения нацеливающих векторов в эмбриональные стволовые (ЭС) клетки. ЭС-клетки получают путем культивирования эмбрионов до имплантации *in vitro* в подходящих условиях (публикации Evans et al., *Nature* 292:154–156 (1981); Bradley et al., *Nature* 309:255–258 (1984); Gossler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065–9069 (1986); и Robertson et al., *Nature* 322:445–448 (1986), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки). Трансгены можно эффективно вводить в ЭС-клетки путем трансфекции ДНК с использованием различных способов, известных в данной области, включая электропорацию, совместное осаждение с фосфатом кальция, слияние с протопластом или сферопластом, липофекцию и DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию. Трансгены могут также быть введены в ЭС-клетки посредством ретровирус-опосредованной трансдукции или путем микроинъекции. Такие трансфицированные ЭС-клетки могут затем колонизировать эмбрион после их введения в бластоцель эмбриона на стадии бластоцисты и вносить свой вклад в зародышевую линию полученного химерного животного (обзор Jaenisch, *Science* 240:1468–1474 (1988), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Перед введением трансфицированных ЭС-клеток в бластоцель трансфицированные ЭС-клетки можно подвергать различным протоколам селекции для обогащения ЭС-клетками, которые имеют встроенный трансген, если трансген обеспечивает средство для такой селекции.

**[0076]** Дополнительно для введения трансгенов в животное, не являющееся человеком, можно также использовать ретровирусную инфекцию. Развитие не являющегося человеком эмбриона можно культивировать *in vitro* до стадии бластоцисты. В течение этого времени бластомеры могут быть мишенями для ретровирусной инфекции (публикация Janenich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1260–1264 (1976), которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Система вирусного вектора, используемая для введения трансгена, обычно представляет собой репликационно-дефектный ретровирус, несущий трансген (Jahner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6927–6931 (1985); Van der Putten et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 82:6148–6152 (1985)). Трансфекцию легко и эффективно осуществляют путем культивирования бластомеров на монослое продуцирующих вирус клеток.

Альтернативно инфицирование можно осуществить на более поздней стадии.

Дополнительные способы применения ретровирусов или ретровирусных векторов для создания трансгенных животных, известные в данной области техники, включают микроинъекцию ретровирусных частиц или клеток, продуцирующих ретровирус обработанных митомицином С-клеток в перивителлиновое пространство фертилизированных яйцеклеток или ранних зародышей (публикация WO90/08832, принадлежащая Opions, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

**[0077]** В любом варианте осуществления трансгенные животные, не являющиеся человеком, экспрессируют слитный белок калликреина-2 на поверхности всех своих клеток. В любом варианте осуществления трансгенные животные, не являющиеся человеком, экспрессируют слитный белок калликреина-2 в некоторых, но не во всех своих клетках, т. е. экспрессия слитного белка контролируется с помощью специфического для клеток промотора и/или энхансерных элементов, расположенных перед трансгеном. В одном варианте осуществления трансгенное животное, не являющееся человеком, экспрессирует слитный белок калликреина-2 только в клетках предстательной железы. В соответствии с данным вариантом осуществления описания специфическая для клеток предстательной железы промоторная последовательность функционально связана с рекомбинантным нуклеотидным конструктом, кодирующим слитный белок калликреина-2. Приемлемые простатспецифические промоторы включают, без ограничений, промотор простатспецифического антигена (PSA), промотор пробазина, промотор простатспецифического мембранного антигена (PSMA) и промотор мышинового вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV LTR). Экспрессионные или клонирующие конструкты, приемлемые для обеспечения экспрессии трансгена в трансгенном животном, хорошо известны в данной области техники. К другим компонентам экспрессионного конструкта относятся сайт сильного полиаденилирования, соответствующие сайты рестрикционной эндонуклеазы и интроны для обеспечения сплайсинга транскрипта.

**[0078]** Рекомбинантный нуклеотидный конструкт, кодирующий слитный белок калликреина-2, может быть введен в любое животное, не являющееся человеком. Предпочтительно животное представляет собой грызуна, более предпочтительно животное представляет собой мышь. Приемлемые линии мышей, обычно применяемые

для получения трансгенных моделей, включают, без ограничений, мышей CD-1<sup>®</sup> Nude, мышей NU/NU, мышей BALB/C Nude, мышей BALB/C, мышей NIH-III, мышей SCID<sup>®</sup>, аутбредных мышей SCID<sup>®</sup>, мышей SCID Beige, мышей C3H, мышей C57BL/6, мышей DBA/2, мышей FVB, мышей CB17, мышей 129, мышей SJL, мышей B6C3F1, мышей BDF1, мышей CDF1, мышей CB6F1, мышей CF-1, мышей Swiss Webster, мышей SKH1, мышей PGP и мышей B6SJL.

**[0079]** В любом варианте осуществления рекомбинантный нуклеотидный конструктор, кодирующий слитный белок калликреина-2, вводят млекопитающему, не являющемуся мышью, например овце, козам, свиньям, собакам, кошкам, обезьянам, шимпанзе, хомякам, кроликам, коровам и морским свиньям (см., например, публикации Kim et al., “Development of a Positive Method for Male Stem-cell Mediated Gene-transfer in Mouse and Pig,” *Mol. Reprod. Dev.* 46(4): 515–526 (1997); Houdebine, “The Production of Pharmaceutical Proteins from the Milk of Transgenic Animals,” *Reprod. Nutr. Dev.* 35(6):609–617 (1995); Petters, “Transgenic Livestock as Genetic Models of Human Disease,” *Reprod. Fertil. Dev.* 6(5):643–645 (1994); Schnieke et al., “Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts,” *Science* 278(5346):2130–2133 (1997); Amoah & Gelaye, “Biotechnology Advances in Goat Reproduction,” *J. Animal Science* 75(2):578–585 (1997), которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки).

**[0080]** Трансгенных животных подвергают скринингу и оценке для отбора животных, имеющих фенотип, в котором слитный белок калликреина-2 экспрессируется во всех клетках или в подгруппе клеток, например в клетках предстательной железы. Начальный скрининг может быть выполнен с использованием, например, методик Саузерн-блоттинга или ПЦР для анализа клеток животных и проверки, что интеграция трансгена произошла. Уровень экспрессии мРНК трансгена в клетках трансгенных животных можно также оценивать с использованием методик, которые включают, без ограничений, анализ образцов тканей, полученных от животного, методом Нозерн-блоттинга, анализ гибридизации *in situ* и обратно-транскриптазная ПЦР (от-ПЦР). Экспрессию на клеточной поверхности слитного белка калликреина-2 можно дополнительно оценивать с помощью проточной цитометрии с использованием специфических к человеческому калликреину-2 антител, как описано в настоящем документе (например, антител KL2B1, KL2B53 и KL2B30).

**[0081]** Другой аспект настоящего описания относится к способам идентификации нацеливающихся на калликреин-2 терапевтических агентов. В любом варианте

осуществления терапевтический агент, нацеливающийся на калликреин-2, представляет собой агент, который связывается с калликреином-2, чтобы вызвать терапевтический конечный результат (например, индуцировать гибель клетки). В любом варианте осуществления нацеливающийся на калликреин-2 терапевтический агент представляет собой агент, который непосредственно связывается с калликреином-2 или иным образом взаимодействует с ним и модулирует экспрессию, активность или функции калликреина-2. В любом варианте осуществления терапевтический агент, нацеливающийся на калликреин-2, представляет собой агент, который связывается или иным образом взаимодействует с калликреином-2 для доставки активного агента к клетке, экспрессирующей на поверхности калликреин-2. В любом варианте осуществления терапевтический агент, нацеливающийся на калликреин-2, представляет собой агент, который связывается одновременно с калликреином-2 и с иммунными клетками (например, Т-лимфоцитами, натуральными киллерными клетками, макрофагами, Т-клетками, полученными из iPSC, или NK-клетками, полученными из iPSC) и опосредует уничтожение иммунными клетками клеток, экспрессирующих на поверхности калликреин-2.

**[0082]** В соответствии с этим аспектом описания способ идентификации нацеливающихся на калликреин-2 агентов включает обеспечение препаратов клеток, описанных в настоящем документе, причем клетки препарата экспрессируют на своей поверхности слитный белок калликреина-2 (например, слитный белок, содержащий полипептидную последовательность калликреина-2, участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2, и домен GPI-анкера, соединенный с участком присоединения GPI). Способ дополнительно включает введение потенциального нацеливающегося на калликреин-2 агента в препарат клеток и определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2 или модифицирует ли иным образом экспрессию, функцию или активность калликреина-2 на основании указанного введения.

**[0083]** В любом варианте осуществления способ дополнительно включает обеспечение второго препарата клеток, причем клетки второго препарата не были модифицированы для экспрессии слитного белка калликреина-2, как описано в настоящем документе. Сравнение конечного результата, используемого для определения, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2 или иным образом модифицирует функцию, экспрессию или активность калликреина-2, для

препарата клеток, модифицированных для экспрессии слитного белка калликреина-2 и препарата клеток, не экспрессирующих слитный белок калликреина-2 (т. е. контрольного препарата клеток), демонстрирует антигенную специфичность потенциального агента к калликреину-2. В любом варианте осуществления второй препарат клеток является изогенным для препарата клеток, модифицированных для экспрессии слитного белка калликреина-2.

**[0084]** Приемлемые препараты клеток для применения в способах, описанных в настоящем документе, подробно описаны *выше*. В любом варианте осуществления препарат клеток представляет собой препарат раковых клеток. В любом варианте осуществления препарат клеток представляет собой препарат клеток рака предстательной железы (РСа).

**[0085]** Альтернативно данный способ включает получение животного, не являющегося человеком, содержащего клетки, которые экспрессируют на поверхности рекомбинантный слитный белок калликреина-2. Как описано *выше*, слитный белок калликреина-2 животного, не являющегося человеком, включает полипептидную последовательность калликреина-2, участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2, и домен GPI-анкера, связанный с участком присоединения GPI. Способ дополнительно включает введение потенциального нацеливающегося на калликреин-2 терапевтического агента животному, не являющемуся человеком, и определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2, на основании указанного введения. Введение потенциального терапевтического агента, нацеливающегося на калликреин-2, животному, не являющемуся человеком, можно осуществлять с использованием любых приемлемых способов, например парентерального, местного, перорального, внутривенного, подкожного, внутрибрюшинного, интраназального или внутриопухолевого способа введения.

**[0086]** В любом варианте осуществления способ дополнительно включает обеспечение второго животного, не являющегося человеком, которое не содержит клеток, модифицированных для экспрессии слитного белка калликреина-2, как описано в настоящем документе. Сравнение конечного результата, используемого для определения, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2 или иным образом модифицирует функцию, экспрессию или активность калликреина-2, у не являющегося человеком животного, содержащего препарат клеток, модифицированных

для экспрессии слитного белка калликреина-2, и у не являющегося человеком животного, лишенных таких модифицированных клеток, демонстрирует антигенную специфичность потенциального агента к калликреину-2. В любом варианте осуществления второе не являющееся человеком животное является изогенным не являющемуся человеком животному, содержащему клетки, модифицированные для экспрессии слитного белка калликреина-2.

**[0087]** Приемлемые в соответствии с настоящим описанием не являющиеся человеком животные более подробно описаны *выше*.

**[0088]** В соответствии с этими способами потенциальный агент представляет собой любой потенциальный терапевтический агент, нацеливающийся на калликреин-2. Приемлемые потенциальные нацеливающиеся терапевтические агенты, включают, без ограничений, любой химический или фармацевтический объект (например, низкомолекулярные связывающиеся с калликреином-2 агенты), биологическую молекулу, связывающуюся с калликреином-2 (например, связывающийся с калликреином-2 пептид, антитело к калликреину-2, фрагмент антитела, моноклональное антитело и т. д.), терапию Т- или НК-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) к калликреину-2.

**[0089]** В любом варианте осуществления потенциальный нацеливающийся на калликреин-2 агент включает детектируемую метку (например, агента можно обнаруживать прямым или косвенным методом). В некоторых случаях потенциальный нацеливающийся на калликреин-2 агент метят напрямую (например, агент может включать непосредственно обнаруживаемый аддукт, такой как флуоресцентный аддукт). В некоторых случаях потенциальный агент метят опосредованно (например, агент может включать опосредованно обнаруживаемый аддукт, такой как биотин).

**[0090]** В любом варианте осуществления определение, связывается ли потенциальный нацеливающийся на калликреин-2 агент со слитным белком калликреина-2 или иным образом взаимодействует с ним, можно осуществлять посредством измерения количества потенциального агента, связанного с клеткой, экспрессирующей слитный белок калликреина-2. Измерение количества потенциального агента, связанного с клеткой, экспрессирующей слитный белок калликреина-2, может давать качественные или количественные результаты. В любом варианте осуществления измерение можно проводить с использованием проточной цитометрии, твердофазного ИФА или любого другого способа, который может количественно измерять количество потенциального агента, присутствующего или

связанного с клетками, экспрессирующими слитный белок калликреина-2. Количество (уровень) связавшегося потенциального агента может быть выражено в произвольных единицах, связанных с конкретным анализом (например, единицах флуоресценции, например средней интенсивности флуоресценции (MFI)), или может быть выражено как абсолютное значение в определенных единицах (например, количество молекул (например, молей), количество молекул белка, концентрация агента и т. д.). Кроме того, количественно измеренное количество (уровень) можно сравнить с эталонной величиной для получения нормализованного значения, которое представляет нормализованное измеренное количество.

**[0091]** В любом варианте осуществления определение, является ли потенциальный агент терапевтическим средством, нацеленным на калликреин-2 или иным образом взаимодействующим со слитным белком калликреина-2, можно осуществлять посредством измерения последующего терапевтического результата, например антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплемент-зависимой цитотоксичности. Способы измерения клеточной цитотоксичности, гибели клеток и/или жизнеспособности клеток хорошо известны специалистам в данной области.

**[0092]** Представленные ниже примеры приведены для дополнительного описания некоторых из описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Целью примеров является иллюстрация, а не ограничение описанных вариантов осуществления. Аналогичным образом, изобретение не ограничено какими-либо конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Более того, после прочтения настоящего описания специалистам в данной области может быть очевидно существование множества модификаций и вариаций настоящего изобретения, и такие вариации могут быть осуществлены без отступления от настоящего изобретения как в отношении его сути, так и в отношении его объема. Таким образом, изобретение должно быть ограничено только прилагаемой формулой изобретения, а также полным объемом аналогичных модификаций, к которым относятся эти пункты формулы изобретения.

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1. Экспрессия слитного белка калликреина-2 на клеточной поверхности**

**[0093]** Ген huKLLK2\_GPI успешно клонировали в вектор pCDH Neo в сайтах рестрикции на 5' XbaI и 3' BamHI (SEQ ID NO: 7). Проводили подтверждение

последовательности размноженной плазмидной ДНК. Lentivirus продуцировали в клетках HEK293TN и трансдуцировали в клетки DU145 в полной среде (EMEM + 10% FBS + 1X MEM-NEAA + 1 X пируват натрия), содержащей TransDux™. Клетки, трансдуцированные геном KLK2-GPI, отбирали в 1 мг/мл реактива Geneticin и анализировали на поверхностную экспрессию KLK2 с помощью проточной цитометрии. Поверхностную экспрессию KLK2 оценивали с использованием антитела KL2B1, конъюгированного с фикоэритрином (Janssen). Поверхностную экспрессию также оценивали с помощью антитела к KLK2, приобретенного в R&D Systems (антитело к калликреину-2 человека; клон 426723; R&D Systems; кат. № MAB4104), а затем вторичного козьего анти-мышинного детекторного антитела, конъюгированного с фикоэритрином (Southern Biotech; кат. № 1030-09). Экспрессию KLK2-GPI обнаруживали на клеточной поверхности трансдуцированных клеток как антителом Jansen (ФИГ. 1 и таблица 3), так и антителом R&D Systems.

**Таблица 3. Интенсивность флуоресценции в клетках DU145, окрашенных антителом к KLK2**

| Образец  | Среднее | Медиана |
|--|---------|---------|
| Нетрансдуцированные клетки DU145                                       | 4646    | 3832    |
| Нетрансдуцированные клетки DU145 + изотипическое контрольное Ат        | 5342    | 4437    |
| Нетрансдуцированные клетки DU145 + Ат KLK-PE                           | 5329    | 4456    |
| Трансдуцированные клетки DU145 + Ат KLK2-PE (разведение вируса: 1 : 2) | 32 745  | 31 139  |
| Трансдуцированные клетки DU145 + Ат KLK2-PE (разведение вируса: 1 : 5) | 33 432  | 31 836  |

### Пример 2. Оценка линий клеток DU145/KLK2\_GPI и PC3/KLK2\_GPI

[0094] KLK2 с GPI-анкером встраивали в линию клеток опухоли предстательной железы DU145 или PC3, как описано в примере 1 выше. Экспрессия KLK2 на клеточной поверхности была подтверждена проточной цитометрией с использованием специфических антител к KLK2 (Ат) (клоны KL2B1, KL2B30 или KL2B53) (ФИГ. 2А–2В). KL2B1, KL2B30 и KL2B53 распознают различные эпитопы на белке KLK2 и демонстрируют различные аффинности связывания с клетками VCaP (ФИГ. 2А). С другой стороны, эти Ат не распознают исходные опухолевые клетки DU145 или PC3, которые не экспрессируют KLK2 (ФИГ. 2Б и ФИГ. 3А). Экспрессия KLK2 с GPI-анкером приводила к связыванию этих Ат с сконструированными опухолевыми клетками DU145/KLK2\_GPI и PC3/KLK2\_GPI (ФИГ. 2В и ФИГ. 3Б). Кроме того, была

возможна коэкспрессия KLK2\_GPI и PSMA, что дает линии клеток, положительные в отношении как KLK2, так и PSMA, которые используют для валидации терапевтических стратегий с двойным нацеливанием (ФИГ. 3В).

**[0095]** Для оценки линий клеток DU145/KLK2\_GPI и PC3/KLK2\_GPI

5 использовали три разных схемы терапии — (1) зависимую от антитела KLK2 клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), (2) биспецифические антитела KLK2 X CD3 и (3) CAR-T-клетки против KLK2.

***Анализ ADCC, опосредованной антителом к KLK2***

**[0096]** Для анализа ADCC, опосредованной антителом к KLK2, NK-клетки

10 периферической крови здорового донора (PB-NK) культивировали совместно с опухолевыми клетками предстательной железы VCaP, DU145 или PC3 с экспрессией KLK2 или без нее (ФИГ. 4А–4В и ФИГ. 5А–5Б). Линия опухолевых клеток VCaP представляет собой единственную опухолевую линию, которая экспрессирует эндогенную KLK2 на клеточной поверхности. Эти опухолевые клетки могут

15 лизироваться клетками PB-NK в присутствии антител к KLK2 либо на hIgG1 Fc, либо на низко фукозилированном Fc (LF) (ФИГ. 4А). Изотипический контроль (hIgG1 изотип.) или антитело против KLK2 с неактивным Fc (aKLK2-неактивн.) не позволяли опосредовать ADCC против клеток VCaP. Результаты, представленные на ФИГ. 4А–4В, дополнительно демонстрируют, что антитело к KLK2 на Fc hIgG1 или LF опосредовали

20 дозозависимым образом ADCC против DU145/KLK2\_GPI, но не против исходных клеток DU145, которые не экспрессируют KLK2. Низкофукозилированные антитела к KLK2 (антитела к KLK2 LF) были более эффективными, чем то же антитело с человеческим Fc IgG1 дикого типа (антитело к KLK2 hIgG1) к VCaP или DU145/KLK2\_GPI, и это указывает на то, что антитело LF усиливает ADCC

25 относительно нормально фукозилированного hIgG1. Изотипический контроль (hIgG1 изотип.) или антитело к KLK2 на неактивном Fc (антитело к KLK2 неактивн.) не опосредовали ADCC против опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI. Аналогичные результаты наблюдали на клетках опухоли предстательной железы PC3/KLK2\_GPI (ФИГ. 5А–5Б). Эти результаты демонстрируют нацеленное на KLK2-антиген

30 уничтожение опухолевых мишеней и пригодность изогенных пар линий клеток. Поскольку множество попыток нокаута KLK2 в опухолевых клетках VCaP были неудачными, применение новых изогенных пар линий клеток имеет решающее значение для демонстрации антигенспецифического ответа на KLK2 для терапевтических средств, нацеленных на KLK2.

### ***Анализы уничтожения, опосредованного биспецифическим антителом KLK2 X CD3***

**[0097]** Для анализов уничтожения, опосредованного биспецифическим антителом KLK2 X CD3, клетки периферической крови здоровых доноров совместно  
5 культивировали с опухолевыми клетками VCaP, LnCap/KLK2 или DU145/KLK2\_GPI (ФИГ. 6). Биспецифическое Ат KLK2 X CD3 индуцировало дозозависимый лизис всех трех клеток-мишеней с наивысшей чувствительностью к клеткам VCaP с эндогенной экспрессией. Уничтожение опухолевых клеток DU145/KLK2\_GPI не было столь эффективным, как VCaP, но максимальные уровни уничтожения были схожими между  
10 этими двумя линиями клеток, и это указывает на то, что KLK2, прикрепленный посредством GPI, был распознан биспецифическим Ат. Максимальное уничтожение LnCap/KLK2 было значительно ниже, возможно, из-за относительно низкого уровня экспрессии KLK2 на LnCap, по сравнению с VCaP и DU145/KLK2\_GPI. Экспрессия KLK2 в линии клеток LnCap/KLK2 не связана с GPI-анкером. Это дополнительно  
15 демонстрирует, что KLK2 с GPI-анкером является полезным инструментом для высокоуровневой экспрессии KLK2 на клеточной поверхности.

### ***Оценка функциональности CAR-T***

**[0098]** Для оценки функциональности CAR-T, Т-клетки здорового донора трансдуцировали CAR против KLK2 и совместно культивировали с VCaP, исходными  
20 DU145 или DU145/KLK2\_GPI (ФИГ. 7А–7В). Хотя нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) уничтожали клетки VCaP с умеренной эффективностью вследствие аллогенного распознавания, CAR-T-клетки против KLK2 уничтожали клетки VCaP более эффективно, чем нетрансдуцированные Т-клетки, демонстрируя CAR-опосредованную цитотоксичность (ФИГ. 7А). CAR-T-клетки против KLK2 дополнительно  
25 продемонстрировали KLK2-специфический цитолиз в отношении DU145/KLK2\_GPI, но не исходных опухолевых клеток DU145 (ФИГ. 7Б и ФИГ. 7В). И снова, эти результаты указывают на то, что экспрессирующие KLK2 с GPI-анкером линии клеток предстательной железы являются важными инструментами для демонстрации специфичности к KLK2. Это также дополнительно подчеркивает важность изогенных  
30 опухолевых клеток для демонстрации антигенспецифического ответа на KLK2 для терапевтических средств, нацеленных на KLK2.

Клетки DU145 + KLK2 можно использовать для скрининга конструкторов CAR

**[0099]** Клетки NK-101, которые стабильно экспрессируют каждую конструкцию, сортировали при помощи антитела к связывающему домену CAR таким образом, что популяция экспрессирующих CAR-клеток имела чистоту в диапазоне от 86–99%. Эти эффекторные клетки NK-101 + CAR совместно культивировали при соотношении E : T 0,5 : 1 с опухолевыми клетками-мишенями DU145, которые либо экспрессируют (ФИГ. 9А), либо не экспрессируют (ФИГ. 9Б) KLK2. Количество живых опухолевых клеток-мишеней, оставшихся в каждой лунке, подсчитывали каждые 2 часа в течение 5 дней с использованием IncuCyte и нормализовали к лункам, содержащим только опухолевые клетки для получения % живых опухолевых клеток-мишеней. Для определения величины уничтожения клетками врожденного иммунитета, не опосредованного CAR, также тестировали исходные клетки DU145, которые не экспрессируют KLK2. CAR-специфическую цитотоксичность определяли по формуле: CAR-специфическая цитотоксичность =  $(AUC_{DU145 \text{ исходн}}) - (AUC_{DU145 \text{ KLK2}})$  и строили график как на (ФИГ. 9В). Контроли включали нетрансдуцированные клетки NK-101, а также клетки NK-101, экспрессирующие неспецифический CAR (NS CAR-с), который не связывался с KLK2 или что-либо иначе на клетках-мишенях.

**[0100]** Хотя предпочтительные варианты осуществления изображены и описаны подробно в настоящем документе, специалистам в соответствующей области будет очевидно, что различные модификации, дополнения, замены и т. п. могут быть сделаны без отклонения от сущности изобретения, и поэтому считается, что они входят в объем изобретения, как определено в следующей формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный нуклеотидный конструкт, кодирующий слитный белок калликреина-2, причем указанный конструкт содержит:

5 первую нуклеотидную последовательность, кодирующую калликреин-2 (KLK2) или его фрагмент, и

вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность присоединения гликозилфосфатидинозитола (GPI), причем указанная вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения  
10 GPI, расположена с 3' стороны от первой нуклеотидной последовательности, кодирующей калликреин-2.

2. Конструкт по п. 1, причем калликреин-2 представляет собой человеческий калликреин-2.

3. Конструкт по п. 1, причем первая нуклеотидная последовательность  
15 кодирует калликреин-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее фрагмент.

4. Конструкт по п. 1, причем первая нуклеотидная последовательность, кодирующая калликреин-2, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1  
или ее фрагмент.

20 5. Конструкт по п. 1, в котором последовательность присоединения GPI получена из щелочной фосфатазы.

6. Конструкт по п. 5, в котором последовательность присоединения GPI получена из плацентарной щелочной фосфатазы человека.

7. Конструкт по п. 5, в котором вторая нуклеотидная последовательность  
25 кодирует последовательность присоединения GPI, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее фрагмент.

8. Конструкт по п. 7, в котором вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая последовательность присоединения GPI, содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2.

30 9. Конструкт по любому из пп. 1–8, в котором первая и вторая нуклеотидные последовательности конструкта кодируют слитный белок калликреина-2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

10. Конструкт по любому из пп. 1–9, в котором первая и вторая нуклеотидные последовательности конструкта содержат нуклеотидную

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

11. Конструкт по п. 10, содержащий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3.

5 12. Конструкт по любому из пп. 1–10, дополнительно содержащий: нуклеотидную последовательность промотора, расположенную с 5' стороны от первой нуклеотидной последовательности, кодирующей калликреин-2.

13. Конструкт по п. 12, в котором нуклеотидная последовательность промотора представляет собой последовательность промотора млекопитающего.

10 14. Конструкт по п. 13, в котором нуклеотидная последовательность промотора представляет собой нуклеотидную последовательность промотора EF1 $\alpha$

15. Вектор, содержащий конструкт по любому из пп. 1–14.

16. Вектор по п. 15, представляющий собой вирусный вектор.

15 17. Вектор по п. 16, причем указанный вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора, лентивирусного вектора, вектора осповакцины, ретровирусного вектора и вирусного вектора простого герпеса.

18. Клетка, содержащая рекомбинантный конструкт по любому из пп. 1–14 или вектор по любому из пп. 15–17.

20 19. Слитный белок калликреина-2, кодируемый конструктом по любому из пп. 1–14 или вектором по любому из пп. 15–17.

25 20. Слитный белок калликреина-2 по п. 19, причем указанный слитный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6.

21. Препарат клеток, причем клетки препарата модифицированы для экспрессии на своей поверхности рекомбинантного слитного белка калликреина-2, при этом указанный слитный белок содержит:

полипептидную последовательность калликреина-2;

30 участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с полипептидной последовательностью калликреина-2 на ее С-конце; и

домен GPI-анкера, соединенный с участком последовательности присоединения GPI.

22. Препарат по п. 21, причем полипептидная последовательность калликреина-2 представляет собой полипептидную последовательность калликреина-2 человека.

23. Препарат по п. 21, причем полипептидная последовательность калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или ее фрагментом.

24. Препарат по п. 23, причем полипептидная последовательность калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или ее фрагмент.

25. Препарат по любому из пп. 21–24, причем участок последовательности присоединения GPI получен из щелочной фосфатазы.

26. Препарат по любому из пп. 21–25, причем участок последовательности присоединения GPI получен из плацентарной щелочной фосфатазы человека.

27. Препарат по любому из пп. 21–26, причем участок последовательности присоединения GPI содержит участок аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

28. Препарат по любому из пп. 21–27, причем слитный белок калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7.

29. Препарат по п. 28, причем слитный белок калликреина-2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

30. Препарат по любому из пп. 21–29, причем клетки препарата экспрессируют слитный белок калликреина-2 с рекомбинантного конструкта по любому из пп. 1–14 или вектора по любому из пп. 15–17.

31. Препарат по п. 30, причем клетки препарата содержат рекомбинантный конструкт, стабильно интегрированный в их геном.

32. Препарат по любому из пп. 21–31, причем клетки препарата представляют собой клетки млекопитающего.

33. Препарат по любому из пп. 21–32, причем клетки препарата представляют собой клетки человека.

34. Препарат по любому из пп. 21–32, причем клетки препарата представляют собой клетки грызуна.

35. Препарат по п. 34, причем клетки грызуна представляют собой клетки мыши.

36. Препарат по любому из пп. 21–35, причем клетки представляют собой клетки предстательной железы.

5 37. Препарат по п. 36, причем клетки предстательной железы представляют собой клетки рака предстательной железы.

38. Препарат по любому из пп. 21–37, причем клетки препарата не экспрессируют эндогенный калликреин-2.

10 39. Препарат по любому из пп. 21–38, причем препарат клеток представляет собой линию клеток.

40. Не являющееся человеком животное, содержащее препарат клеток по любому из пп. 21–39.

15 41. Не являющееся человеком животное, содержащее клетки, экспрессирующие на своей поверхности рекомбинантный слитный белок калликреина-2, причем указанный слитный белок содержит:

полипептидную последовательность калликреина-2;

участок последовательности присоединения гликозилфосфатидилинозитола (GPI), связанный с С-концом полипептидной последовательности калликреина-2; и

20 домен GPI-анкера, соединенный с участком последовательности присоединения GPI.

42. Не являющееся человеком животное по п. 41, причем клетки не являющегося человеком животного трансдуцированы рекомбинантным конструктом по любому из пп. 1–14 или вектором по пп. 15–17.

25 43. Не являющееся человеком животное по п. 41, причем рекомбинантный конструкт по любому из пп. 1–11 стабильно интегрирован в геном животного, не являющегося человеком.

44. Не являющееся человеком животное по любому из пп. 41–43, причем указанное не являющееся человеком животное представляет собой грызуна.

30 45. Не являющееся человеком животное по п. 44, причем грызун представляет собой мышь.

46. Способ идентификации агента, который связывается с калликреином-2, включающий:

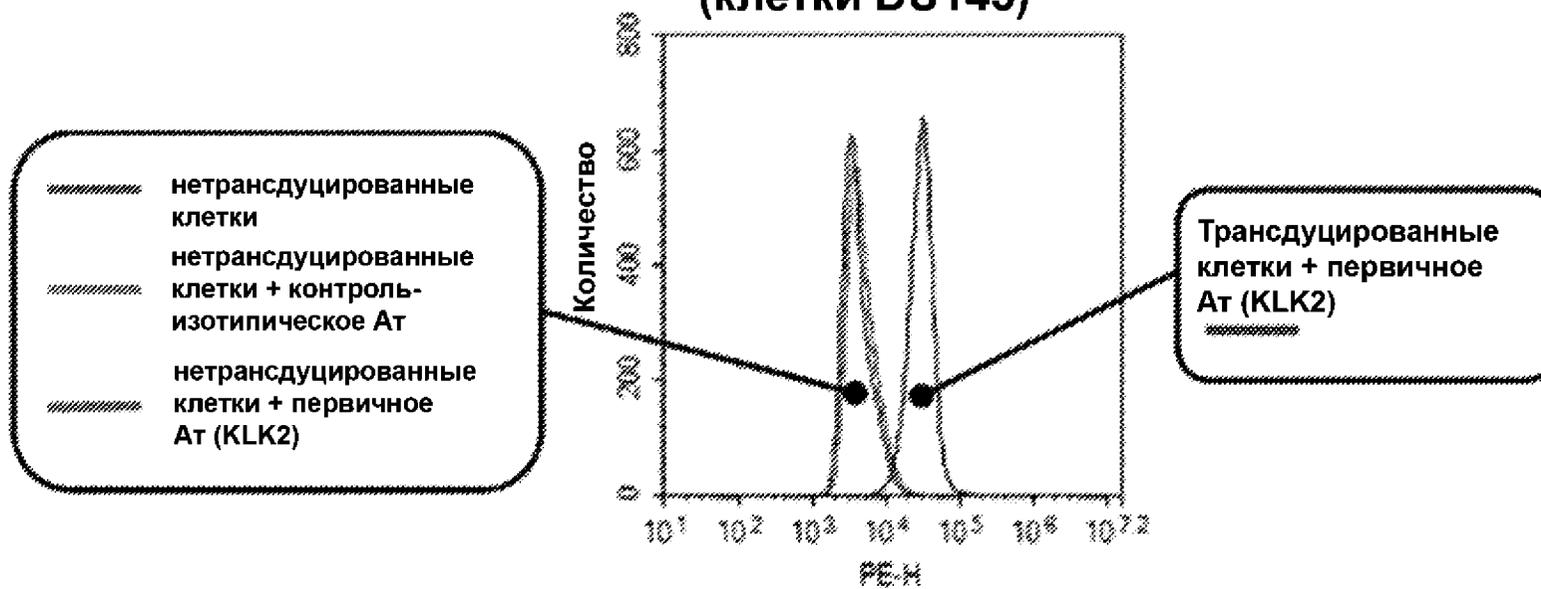
обеспечение препарата клеток по любому из пп. 21–39;

введение потенциального агента в препарат клеток; и

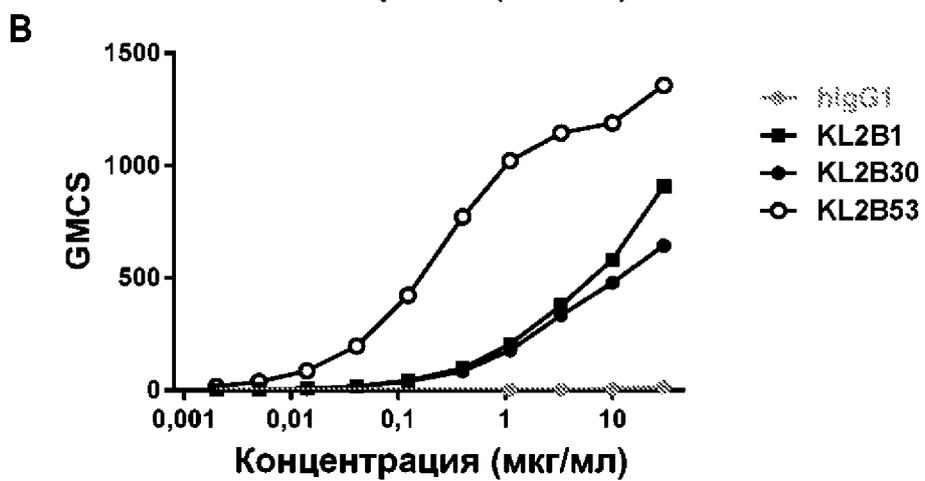
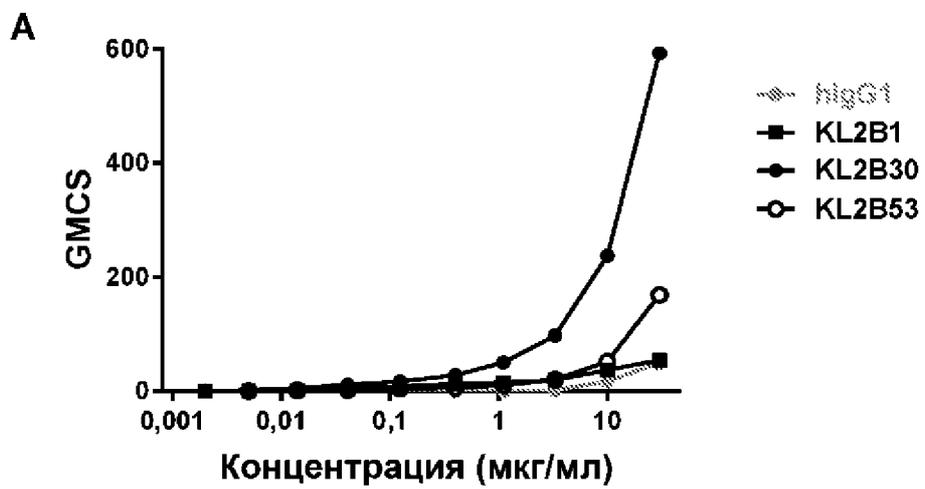
определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2, на основании указанного введения.

- 5 47. Способ идентификации агента, который связывается с калликреином-2, включающий:
- обеспечение не являющегося человеком животного по любому из пп. 40–45;
- 10 введение потенциального агента животному, не являющемуся человеком; и определение, связывается ли потенциальный агент с калликреином-2, на основании указанного введения.
48. Способ по п. 46, в котором препарат клеток представляет собой препарат раковых клеток.
- 15 49. Способ по п. 48, в котором препарат клеток представляет собой препарат клеток рака предстательной железы.
50. Способ по любому из пп. 46–49, в котором потенциальный агент представляет собой потенциальный ингибитор калликреина-2.
- 20 51. Способ по любому из пп. 46–49, в котором потенциальный агент представляет собой антитело к калликреину-2.
52. Способ по любому из пп. 46–49, в котором потенциальный агент представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) к калликреину-2.

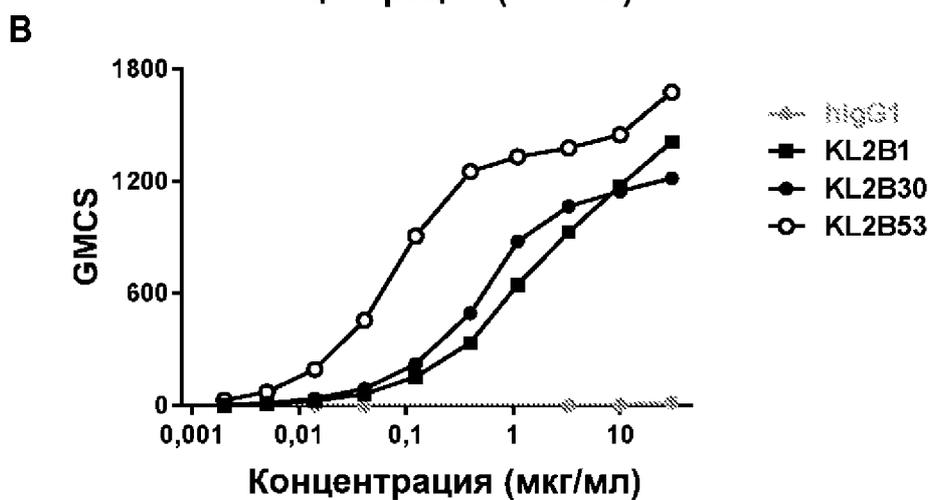
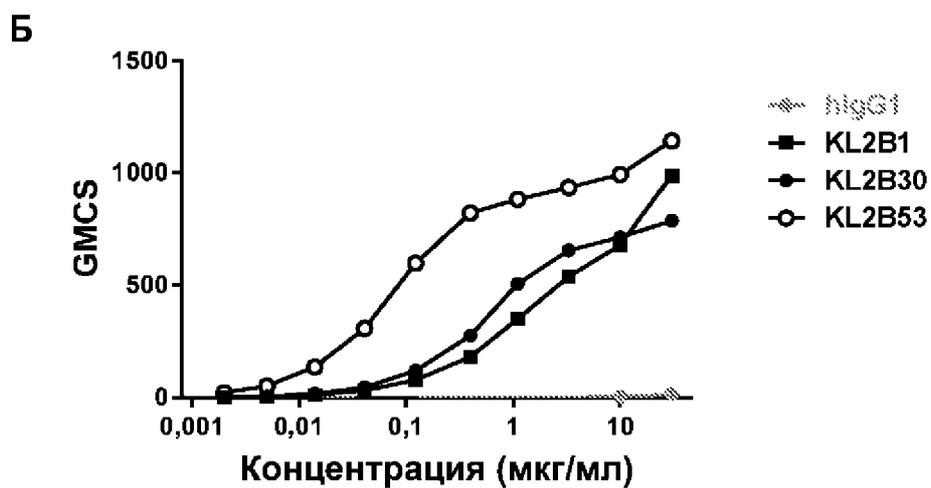
### Экспрессия KLK2 на поверхности (клетки DU145)



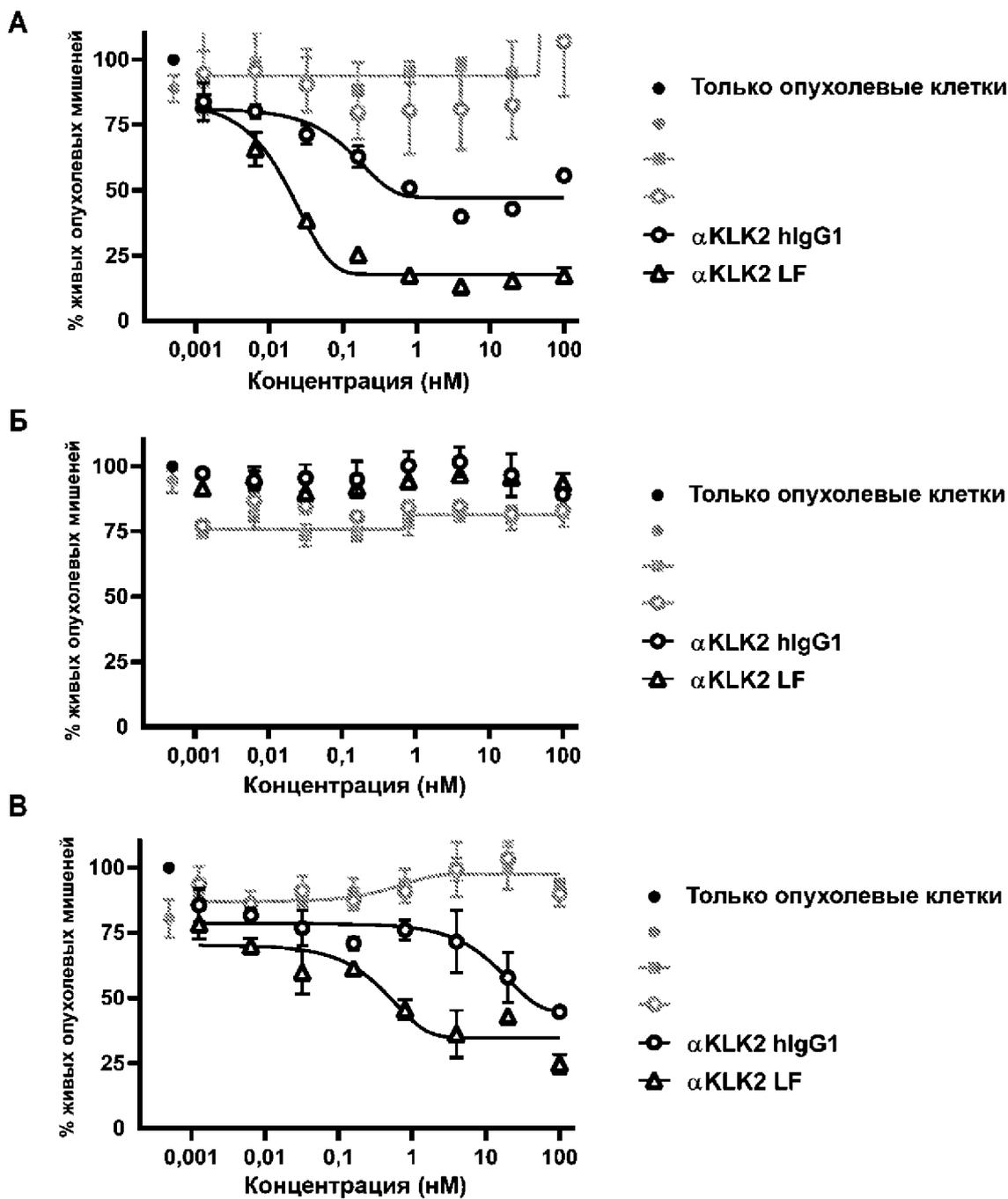
ФИГ. 1



**ФИГ. 2А–2В**

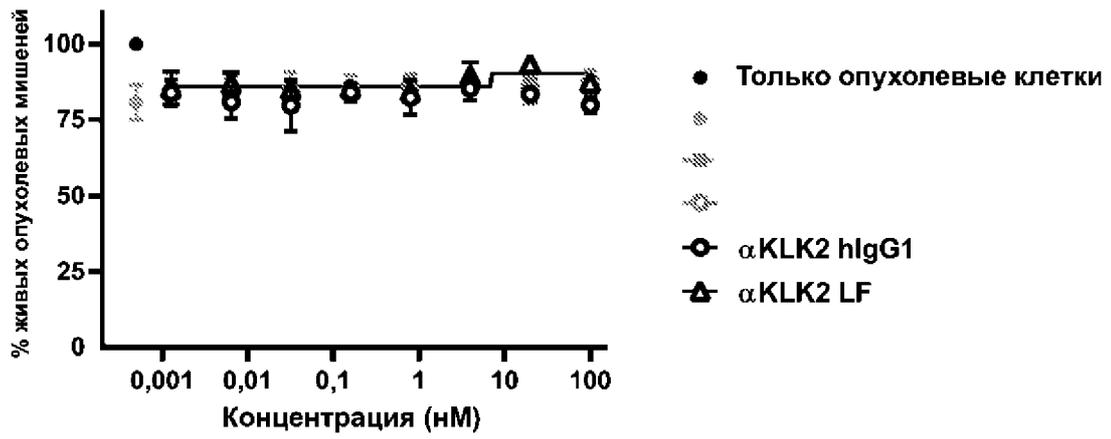


**ФИГ. 3А–3В**

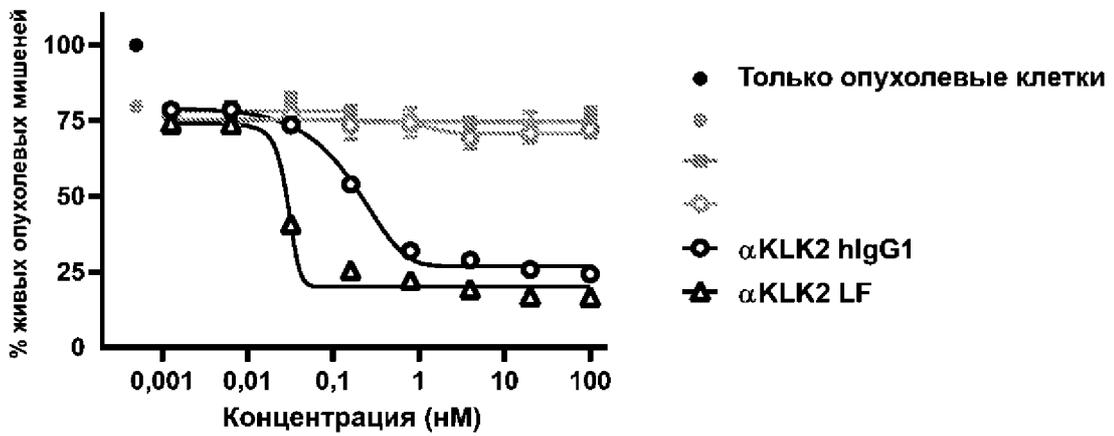


**ФИГ. 4А–4В**

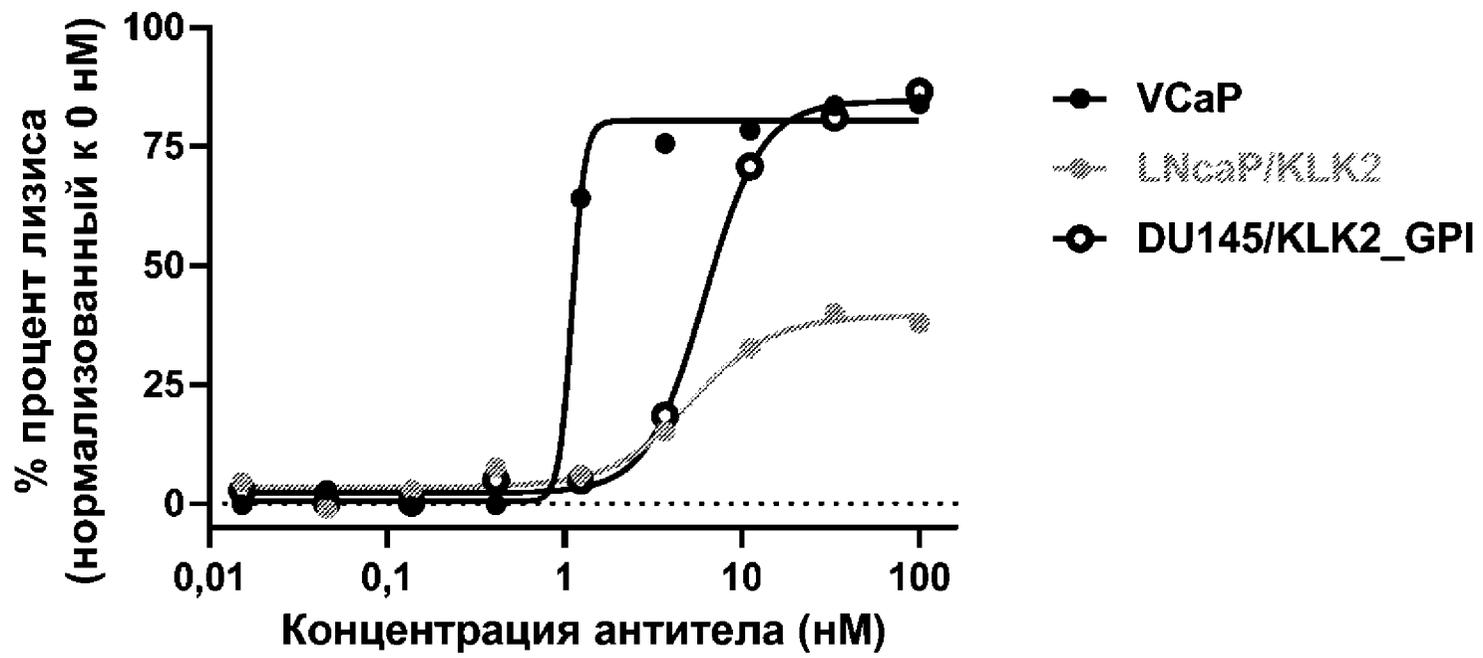
**А**



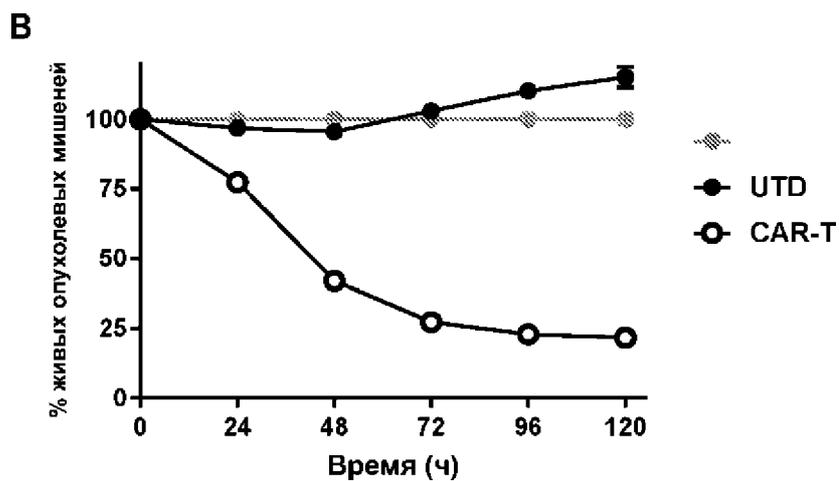
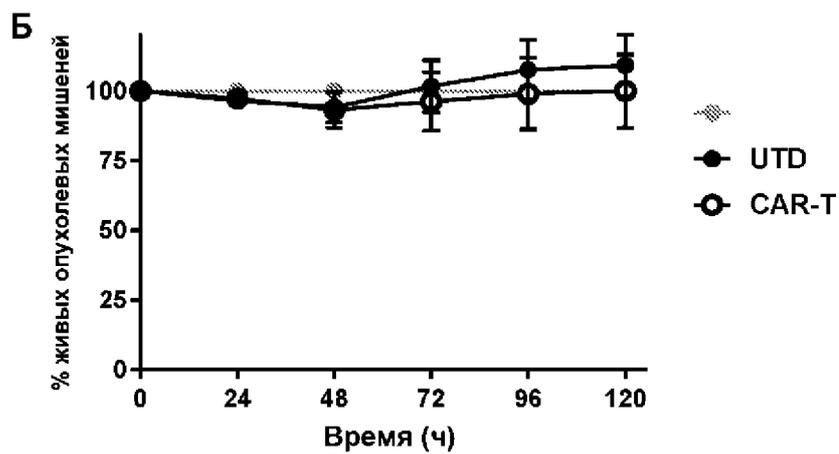
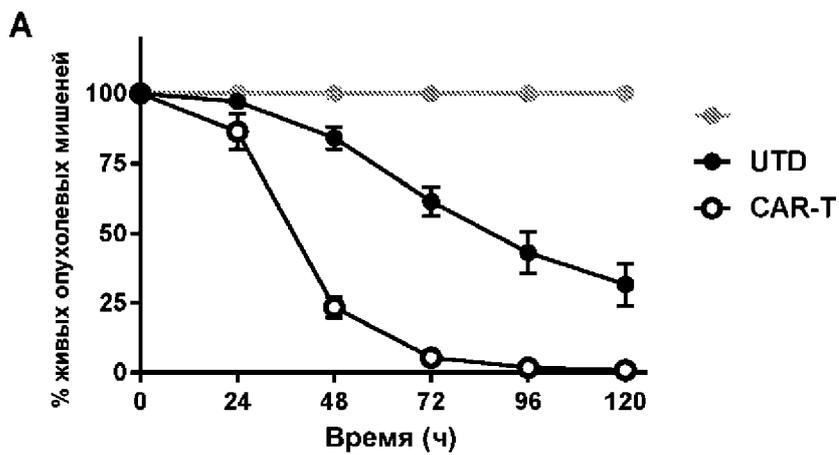
**Б**



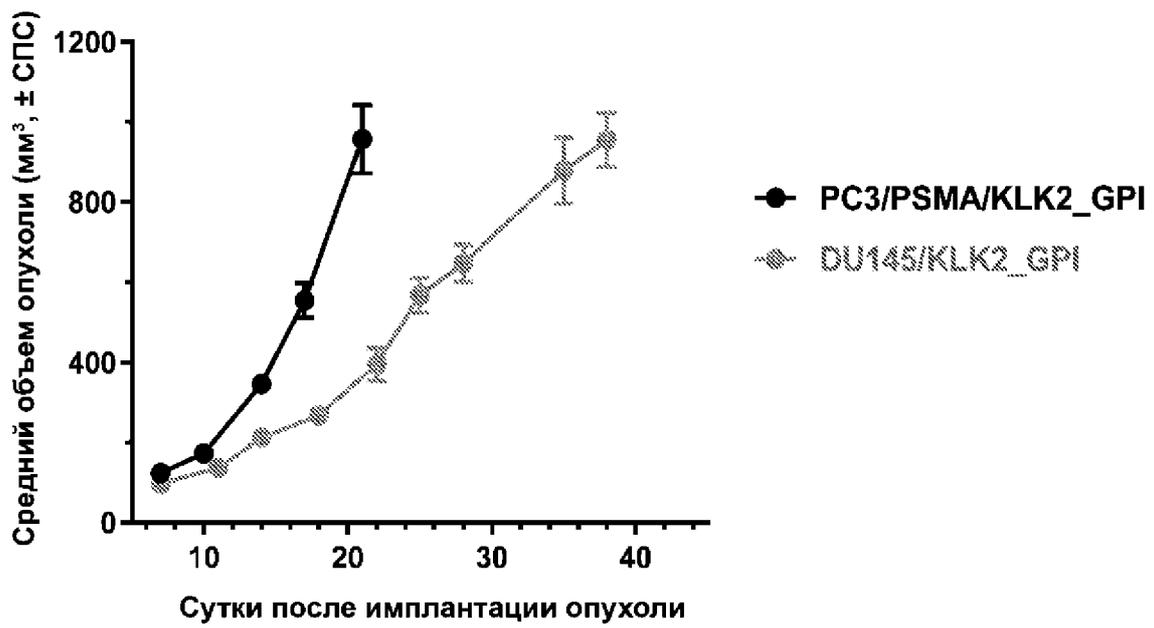
**ФИГ. 5А–5Б**



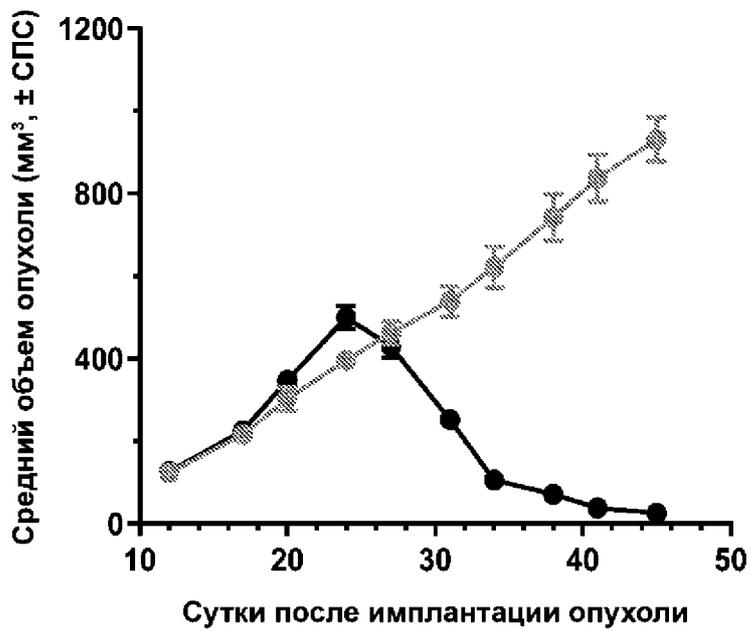
ФИГ. 6



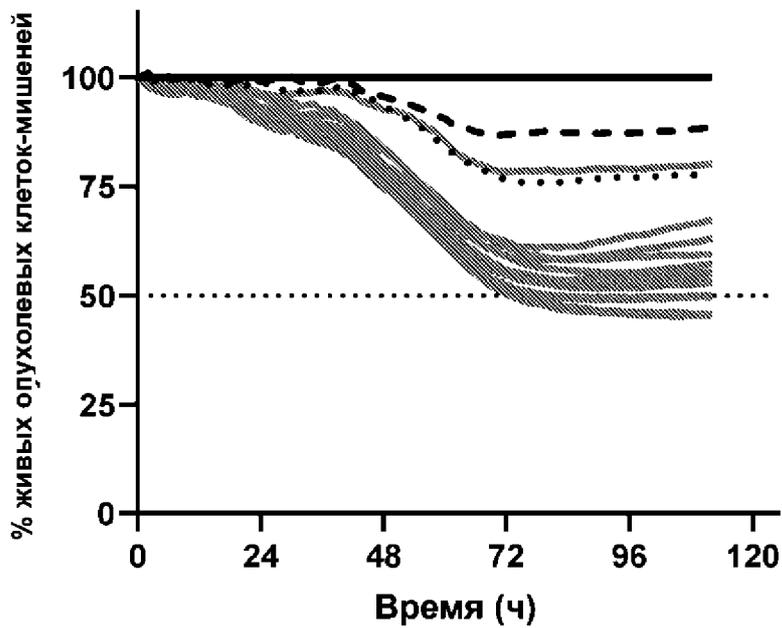
**ФИГ. 7А–7В**



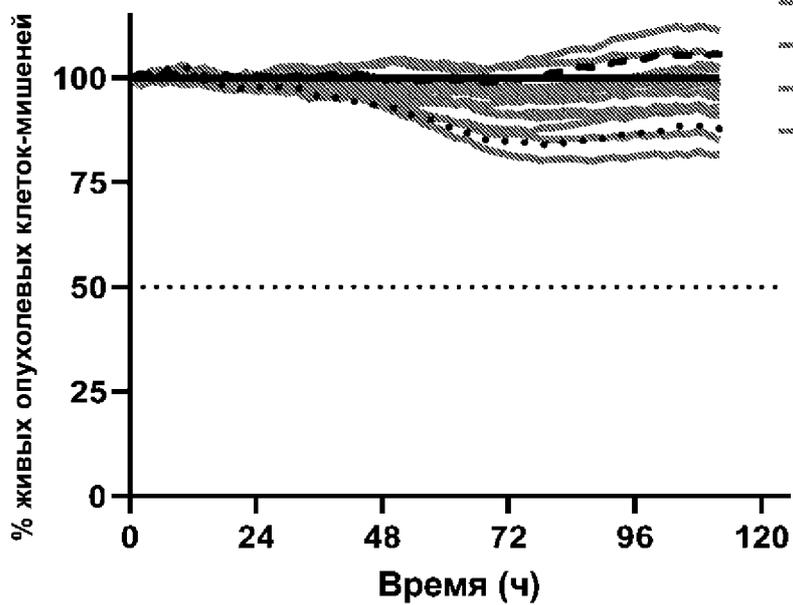
**ФИГ. 8А**



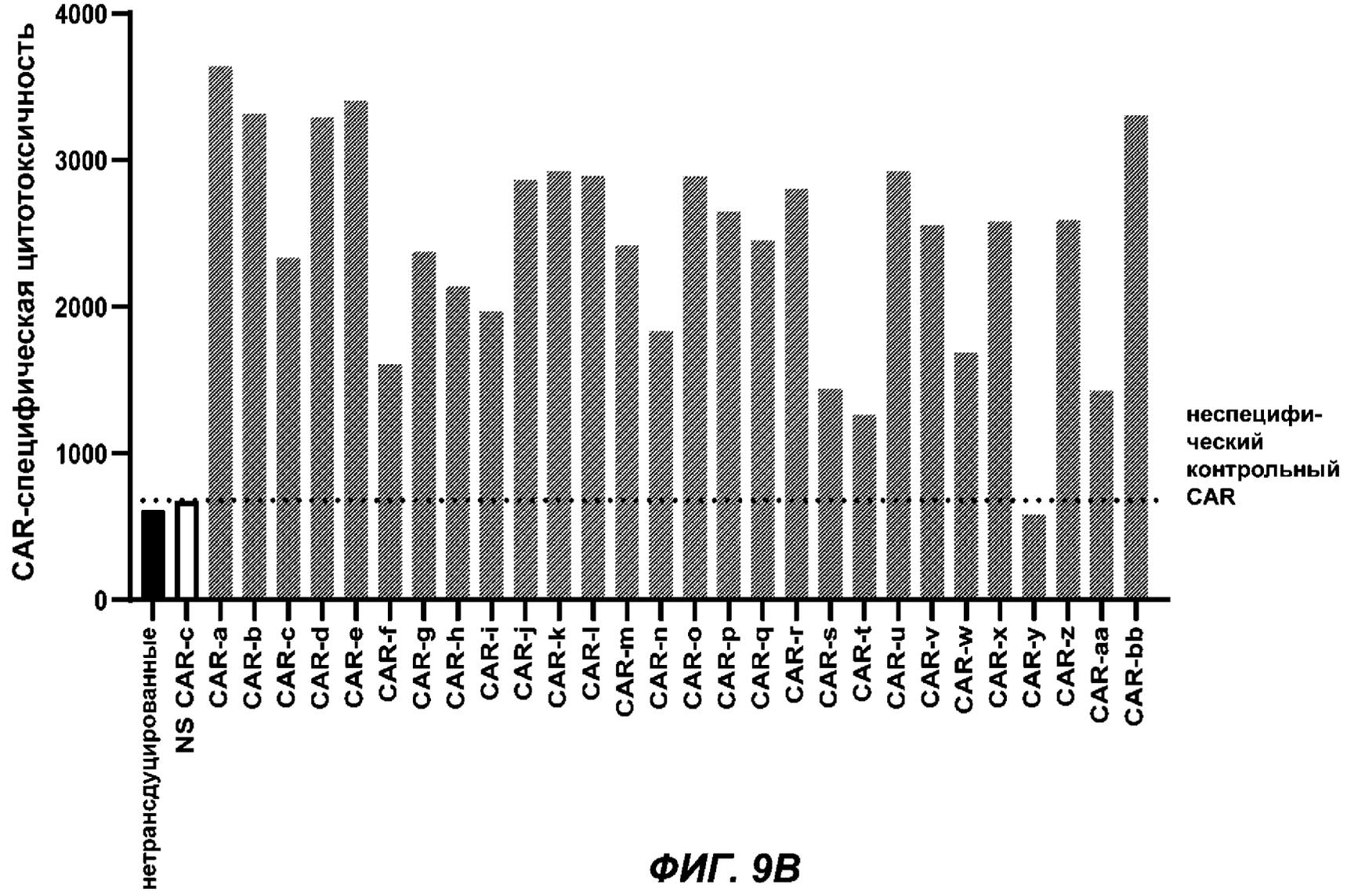
**ФИГ. 8Б**



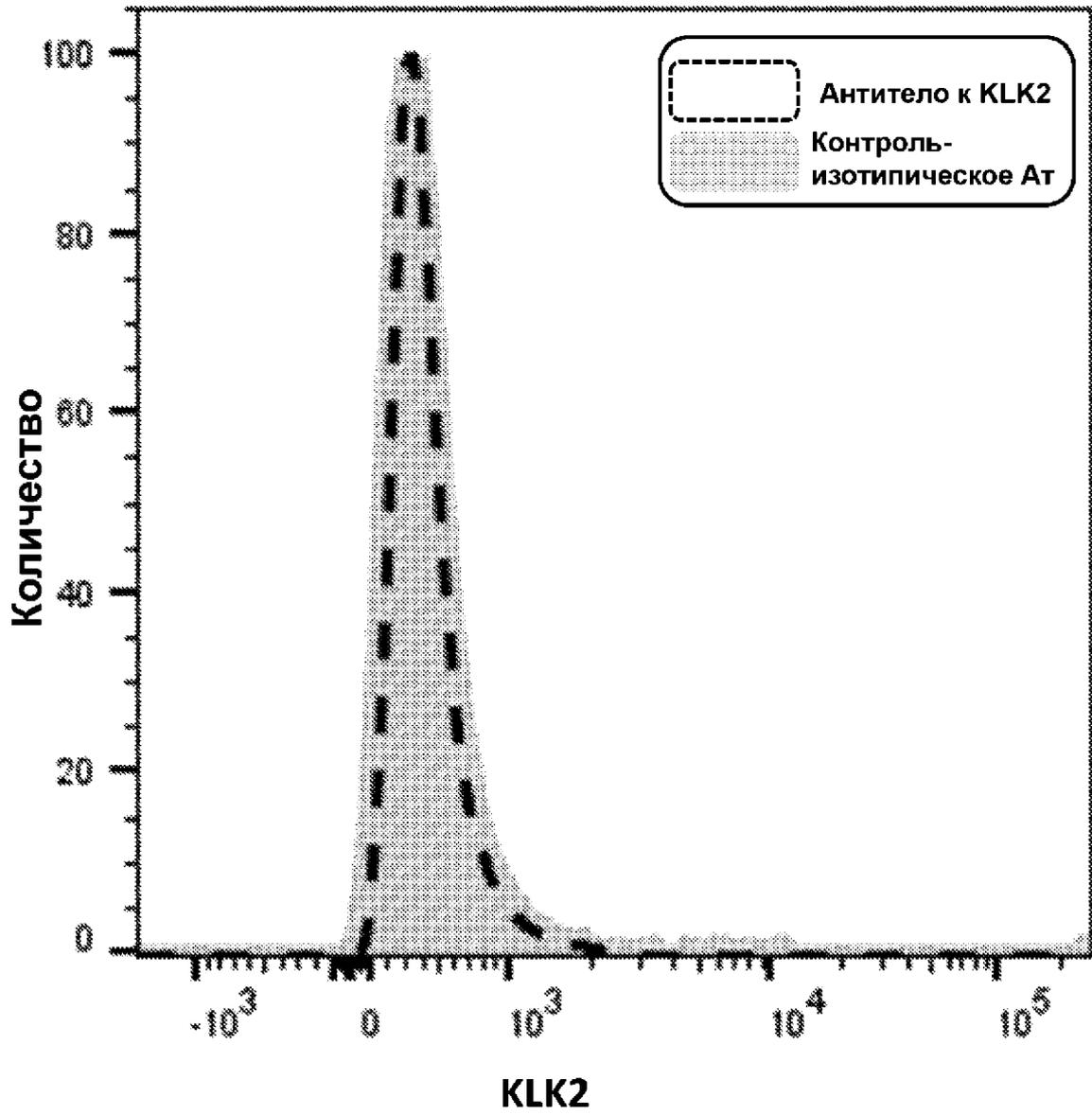
**ФИГ. 9А**



**ФИГ. 9Б**

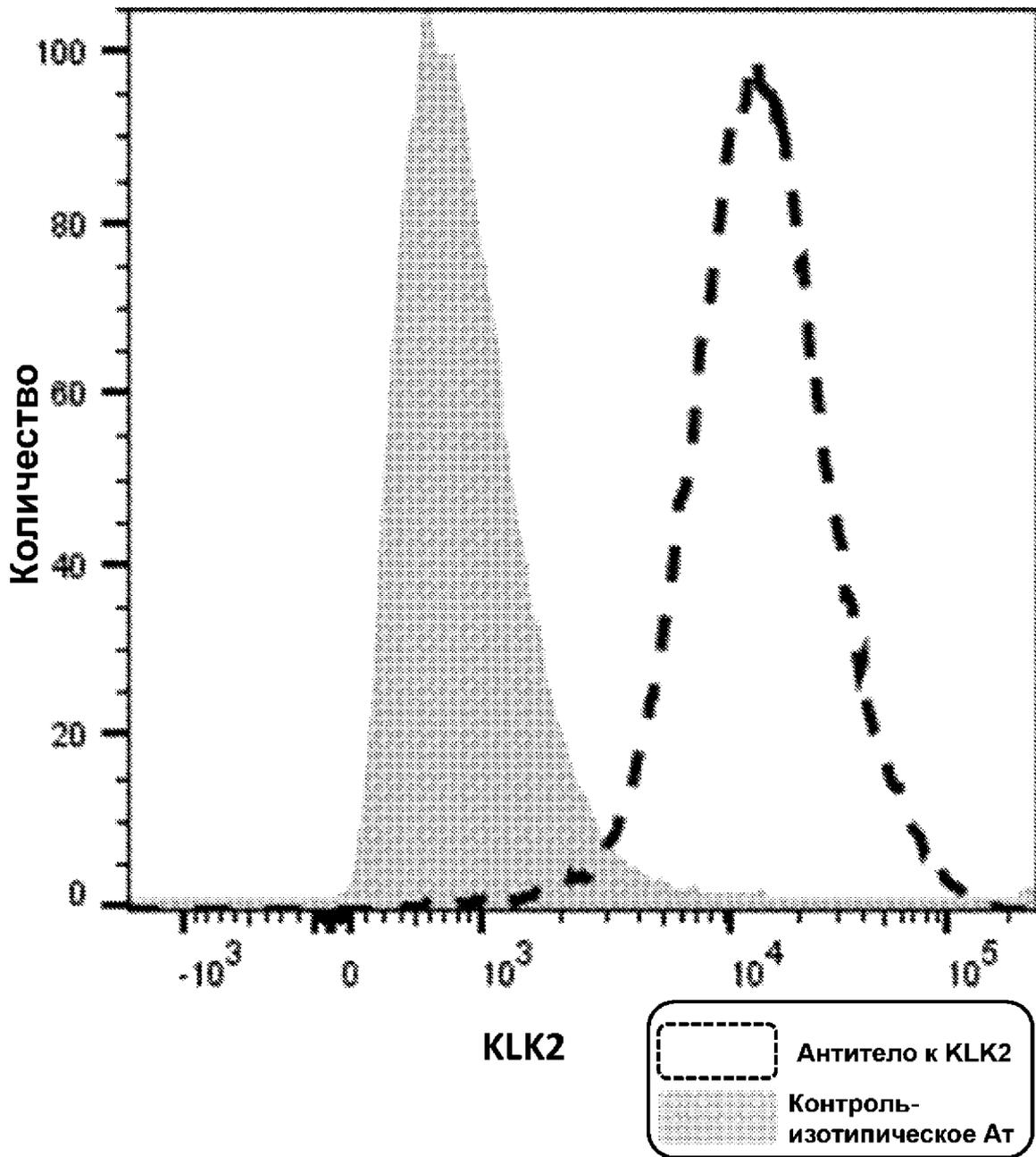


# Исходные LnCaP



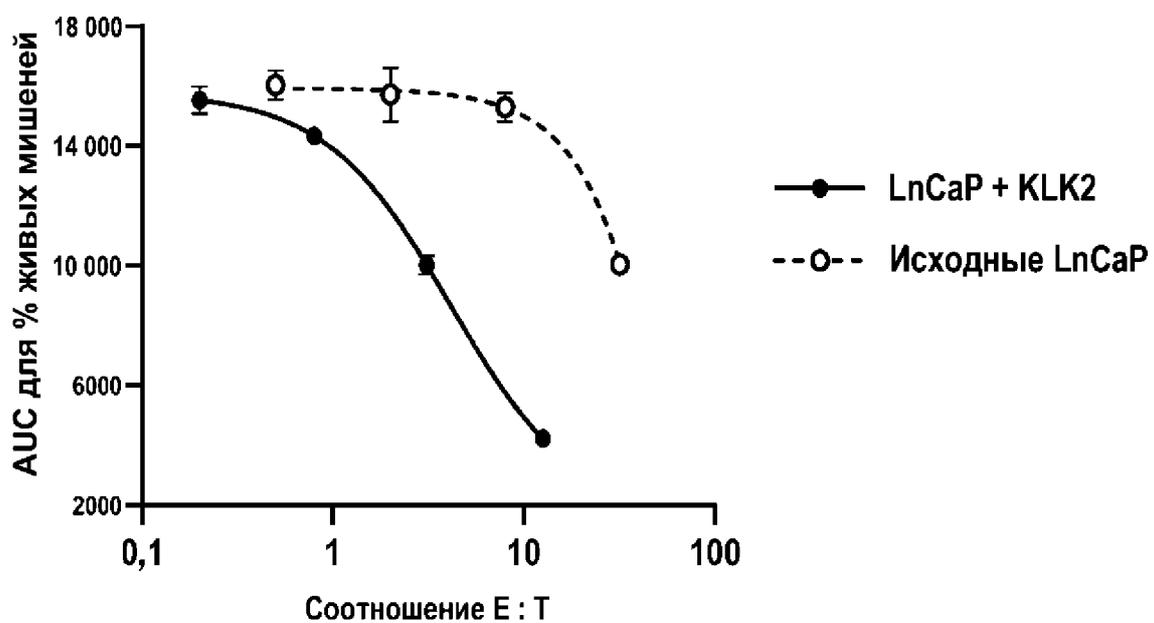
**ФИГ. 10А**

LnCaP/KLK2\_GPI



**ФИГ. 10Б**

**Цитотоксичность нацеленного на KLK2 NK-CAR против  
клеток LnCaP с экспрессией KLK2 и без нее**



**ФИГ. 10В**