



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0017054-2 B1

(22) Data do Depósito: 20/12/2000

(45) Data de Concessão: 04/04/2017



(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE, OLIGÔMEROS E USO DOS MESMOS, BEM COMO SEQUÊNCIA DE DNA RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: C12N 15/62; C12N 15/11; C07K 14/705; A61K 38/17

(30) Prioridade Unionista: 30/12/1999 DE 199 63 859.4

(73) Titular(es): APOXIS SA

(72) Inventor(es): JUERG TSCHOPP; PASCAL SCHNEIDER; NILS HOLLER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE, OLIGÔMEROS E USO DOS MESMOS, BEM COMO SEQUÊNCIA DE DNA RECOMBINANTE".

A presente invenção refere-se a Bi- ou oligômeros de Bi-, tri-,
5 tetra- ou pentâmeros de proteínas de fusão recombinantes, em que as proteínas de fusão recombinantes apresentam pelo menos um componente A e pelo menos um componente B. Além disso, a presente invenção refere-se ao emprego de tais bi- ou oligômeros para a preparação de um medicamento ou o seu emprego para o diagnóstico in-vitro. Finalmente, a presente inven-
10 ção refere-se também a proteínas de fusão, que apresentam um componente A e um componente B, sendo que o componente B contém um fragmento multimerizante ou oligomerizante ou um derivado funcional de um tal fragmento de uma proteína, escolhido do grupo, constituído da família das proteínas C1q ou das colectinas. Também seqüências de DNA, que codificam
15 para uma tal proteína de fusão, bem como vetores de expressão e células hospedeiras, que contêm a seqüência de DNA ou o vetor de expressão, são objeto da presente invenção.

Proteínas, que aparecem fisiologicamente como di-, tri-, tetra- ou pentâmeros, estão presentes em grande número na natureza. Em virtude
20 das ações recíprocas nas superfícies destas proteínas di- ou multimerizantes em solução podem ocorrer armazenagens conjuntas de proteínas espontâneas ou também por exemplo, cineticamente retardadas, pois são dependentes da concentração e/ou do meio. Para isso, são responsáveis ações recíprocas hidrófobas, ligações de pontes de hidrogênio e/ou forças de Coulomb.
25

Além disso, em certas proteínas encontram-se motivos de estrutura, que conduzem à formação de estruturas supersecundárias intermoleculares condicionadas por estruturas específicas e, com isso, a dímeros ou multímeros de proteínas. A formação de estruturas supersecundárias baseia-se nas seqüências de aminoácidos característicos das proteínas que for-
30 mas estes di- ou multímeros. Como estruturas supersecundárias seriam citadas por exemplo, as chamadas "Coiled-Coil-Helices", que provocam uma

di- ou multimerização de proteínas pelas interações das alfa-hélices características, que aparecem em cada proteína formadora da forma Coiled-Coil. A hélice Coiled-Coil como "domínio de di- ou multimerização" intramolecular de proteínas representa-se estruturalmente como superhélice com dois ou mais
 5 filamentos, torcida em si própria. Tais motivos Coiled-Coil aparecem especialmente em dímeros ou multímeros de proteínas extracelulares, mas de modo muito particular em proteínas ou em complexos de proteínas do tecido conjuntivo.

Assim, por exemplo, Beck et al. (J. Mol. Biol. (1996) 256, 909-
 10 923) descrevem uma proteína de tecido conjuntivo, a chamada Cartilage Matrix Protein (CMP), cuja agregação a um homotrímero se baseia na hélice tripla, que representa o resultado da armazenagem comum de três hélices completares (em cada caso como componente de um polipeptídio), com amostra de Coiled-Coil. Para esta seqüência de aminoácidos de uma tal hélice formadora de uma hélice tripla é característico, com isso, a amostra
 15 heptad (abcdefg)_n. Seus aminoácidos nas posições a e d portam usualmente cadeias laterais apolares e permitem, com isso, a formação da estrutura superhelicoidal descrita acima, aqui como hélice tripla de três hélices.

Além disso, encontra-se descrito na literatura, que em uma outra
 20 proteína de matriz extracelular (Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)) mesmo cinco hélices na forma de uma Coiled-Coil com cinco filamentos interagem umas com as outras e, com isso, podem formar pentâmeros. (Kajava, PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 24:218-226 (1996); Malashkevich et al, Science, volume 274, 761-765, 1996).

Além das proteínas da matriz COMP e CMP, que não pertencem
 25 às proteínas da família do colágeno, encontram-se além disso, também nas proteínas da família do colágeno fenômenos de multimerização condicionados pela estrutura específicos pela formação de estruturas supersecundárias. Com isso, a estrutura das fibras de colágeno é caracterizada pelo tropo-
 30 colágeno, que se constitui em três polipeptídios transpostos helicoidais. Também a protofibrila de um cabelo é formada de uma hélice tripla a partir de alfa-queratina com o motivo "Coiled-coil", todavia com passo para a es-

querda.

Para aumentar a afinidade de ligantes, Terskikh et al. (PNAS, volume 94, 1663-1668, 1997) propuseram aplicar proteínas de fusão que apresentam um peptídeo curto com função ligante e os "domínios Coiled-Coil" da proteína da matriz COMP. Para estes pentâmeros pôde ser detectada uma maior afinidade, sendo que os agregados de ordem superior não puderam ser obtidos por este meio.

Além disso, com base em suas homologias de seqüência em seus respectivos segmentos de seqüências multimerizantes, as proteínas Clq, colágeno $\alpha 1$ (X), $\alpha 2$ (VII), a proteína em repouso (hibernating protein) ACRP30, a proteína com estrutura auricular interna, a cerebelina e a multimerina como família da proteína foram reunidas sob a denominação família C1q (Kischore und Reid, Immunopharmacol., 42 (1999) 15-21), que se apresentam igualmente condicionadas pela estrutura como dímeros ou multímeros. Entre as proteínas que aparecem nesta família com propriedades de multimerização está caracterizada por exemplo, a estrutura da proteína C1q, conhecida do sistema complemento, é caracterizada por monômeros que apresentam cada um deles, um segmento de seqüência globular chamado domínio "de cabeça" e um segmento de seqüência helicoidal "semelhante ao colágeno". Os monômeros trimerizam sobre este segmento de seqüência helicoidal, que forma uma hélice tripla Coiled-Coil. Seis destes trímeros C1q forma novamente um oligômero, sendo que novamente a oligomerização dos trímeros de proteína baseiam-se em interações entre as hélices triplas Coiled-Coil individuais. No resultado esta disposição estrutural na proteína ou no complexo de proteína multi- (oligo-) merizado C1q conduz a uma formação denominada como "Bouquet", assegurando-se que 18 domínios "de cabeça" dispostos com terminação C, globulares, são ligados em um hexâmero de trímeros.

Uma estrutura semelhante como na proteína C1q também é encontrada na proteína ACRP30, igualmente uma proteína da família C1q (Hu et al, J. Biol. Chem. Vol. 271, número 18, 10697-10703, 1996). No caso desta proteína do soro secretada por adipócitos trata-se com preponderante

probabilidade de quadrômeros de trímeros, sendo que, tal como também na proteína Clq, os domínios terminados em C, globulares são ligados através de hélices triplas semelhantes ao colágeno. Presumivelmente, quatro destas hélices triplas formam finalmente outra vez um oligômero por interações correspondentes. Na publicação de Shapiro e Scherer (Current Biology 1998, 8 : 335-338) encontra-se representada a estrutura de um homotrímero de ACRP30 determinada com auxílio da análise estrutural de raios X.

Além disso, da literatura são conhecidas proteínas da classe das colectinas, que são caracterizadas por um domínio do tipo do colágeno, uma região do pescoço e além disso, por um domínio de ligação de lecitina terminada em carbóxi globular. Também as colectinas aparecem fisiologicamente como oligômeros de trímeros. Assim, por exemplo, as proteínas trimerizam Lung Surfactant Protein A (SP-A) e a proteína de ligação da manose (MBP), em cada caso da família das colectinas, pelas interações de seu domínio "parecido com o colágeno" e apresentam-se finalmente, como hexâmeros de trímeros (Epstein et al, Current Opinion in Immunology, volume 8, número 1, 1996, 29-35). Com relação a isso, portanto, as proteínas também conhecidas sob a denominação colectinas formam oligômeros (por exemplo, hexâmeros) de multímeros (por exemplo, trímeros).

Da literatura deduz-se, além disso, que inúmeras proteínas que atuam fisiologicamente como moléculas de sinal, podem transduzir um sinal biológico somente em determinados estados. Assim, por exemplo, FasL disposto em posição de membrana tem efeito biológico, isto é, apoptótico, enquanto que após dissociação dos segmentos da proteína extracelular do segmento em posição de membrana (chamado sFasL) esta fração sFasL não ligada com a membrana fisiologicamente não pode mais provocar nenhum efeito apoptótico sobre células alvo. Na publicação de Schneider et al. (J. Exp. Med., Vol. 187, número 8, 1998, 1205-1213) foi descrito, que o efeito biológico de trímeros sFasL, que - tal como foi esclarecido acima - são obtidos após dissociação do segmento de proteína em posição de membrana, pode ser reativado igualmente pela adição de anticorpos reticuladores com relação a sua função fisiológica. Para isso, foi expressa uma proteína de fu-

são, constituída do domínio de trimerização de FasL, de uma seqüência de ligação curta e de uma marcação Flag (com a seqüência de aminoácidos Flag (código de uma letra) DYKDDDDK) e tais proteínas de fusão trimerizadas não condicionadas pela estrutura (isto é, não sobre interações de estrutura secundária específicas com o resultado da formação de uma estrutura supersecundária) são reticuladas pelos anticorpos voltados contra a marcação Flag.

Tais moléculas sFasL reticuladas pela ligação do anticorpo mostra um aumento significativo da atividade apoptótica específica em comparação com os trímeros sFasL não reticulados. Este procedimento proposto por Schneider *et al.*, apresenta, no entanto, a desvantagem, que além das proteínas FasL recombinantes não ligadas com a membrana com o domínio de trimerização também têm ser aplicados anticorpos específicos, isto é, é obtido um aumento da atividade biológica somente pela preparação de uma outra fração da molécula. Além disso, pelo ensinamento proposto por Schneider *et al.* não é possível, assegurar um grau de oligomerização indicado ou determinável exatamente dos multímeros. Os anticorpos podem provocar, na verdade, que os trímeros FasL se liguem aos dímeros ou então também um amplo espectro de complexos oligomerizados apareça até aos enormes agregados sFasL/anticorpos. Já que por exemplo, para o uso medicinal é exigido um produto exatamente definido com máxima eficácia, no resultado, portanto, o processo para a reativação ou para o aumento da atividade sFasL proposto por Schneider *et al.* não é praticável.

Um objetivo central da presente invenção é agora, pôr à disposição compostos, que evitam as desvantagens do estado da técnica, especialmente também apresentem a atividade biológica aumentada ou então causam uma reativação da atividade biológica.

O presente objetivo é solucionado pelo objetivo da reivindicação 1, a saber, bi- ou oligômeros de um di-, tri-, tetra- ou pentâmero de proteínas de fusão recombinantes pelo fato, de que as proteínas de fusão recombinantes apresentam pelo menos um componente A e pelo menos um componente B, sendo que o componente A abrange uma proteína ou um segmento

de proteína com função biológica, especialmente com função de ligação e o componente B abrange uma proteína ou um segmento de proteína, que/o agrega o di-, tri-, tetra- ou pentâmero de uma proteína de fusão recombinante com função biológica sem efeito de moléculas terciárias bi- ou oligomerizadas ou então proteínas de fusão em di- ou multímeros e une estes di- ou multímeros simultaneamente sem efeito de moléculas terciárias em um bi- ou oligômero.

Na apresentação da presente invenção os termos di-, tri-, tetra- ou pentâmero são reunidos sob o termo multímero e compreendem-se sob isto complexos de proteínas de dois, três, quatro ou cinco polipeptídios (proteínas) armazenados juntos. Ao contrário, os agregados da próxima ordem superior, isto é, as agregações de dois ou mais di-, tri-, tetra- ou pentâmeros no sentido acima são denominados como bi- ou oligômeros. Por uma proteína ou segmento de proteína com função biológica (componente A na proteína de fusão) compreendem-se especialmente proteínas, que têm uma função ligante, muito particularmente para anticorpos ou receptores (isto é, como participantes de ligação com uma ou mais molécula(s) podem colocar-se em ação recíproca), seqüências de aminoácidos modificados, por exemplo, seqüências de aminoácidos com substâncias ativas acopladas covalentes ou não covalentes (eventualmente de natureza orgânica-química), anticorpos ou segmentos de anticorpos com paratopos ou seus hormônios, por exemplo, hormônios de peptídios. De modo muito particular a presente invenção abrange seqüências de aminoácidos de proteínas de sinal, que biologicamente já são ativas como monômeros e correspondentemente como componente em um complexo de acordo com a invenção são aumentadas em seu efeito ou então através de sua multi- ou oligomerização introduzida de acordo com a invenção ou pela oligomerização introduzida exclusivamente de acordo com a invenção (desde que já o componente A da proteína de fusão se apresente como trímero) ou se tornam primeiramente ativas, como componente A na proteína de fusão. No caso das proteínas de sinal fisiologicamente em posição de membrana, por exemplo, em citocinas TNF, preferem-se os produtos de dissociação, que abrangem os segmentos

de proteína extramembranosos, especialmente os extracelulares. Mas também seqüências de aminoácidos, que podem atuar como antígenos, podem ser aplicados como componente A na proteína de fusão recombinante. Finalmente, como componente A também podem ser aplicados receptores, por exemplo, receptores da família dos receptores TNF, talvez pertencentes à família das proteínas de membrana tipol (por exemplo, FasR) ou segmentos ou derivados destes receptores, que têm igualmente função de ligação (para que, portanto, entrem em ação recíproca como participantes de ligação com uma outra molécula) e no sentido da presente invenção, por conseguinte, também caem sob o termo "ligante". Tais fragmentos de receptores biológicos capazes de ligação prestam-se especialmente para o emprego como medicamentos, quando o ligante biológico complementar no paciente se apresenta em concentrações não fisiologicamente altas.

Em uma forma de execução preferida os componentes A podem apresentar os componentes A idênticos nos multímeros presentes nos oligômeros de acordo com a invenção, isto é, di-, tri-, tetra- ou pentâmeros (oligômeros de homodi- ou -multímeros) ou diferentes componentes A (oligômeros de heterodi- ou -multímeros). Desta maneira, as proteínas com diferentes componentes A, eventualmente com distinta função biológica podem estar ligadas em di- ou multímeros de oligômeros de acordo com a invenção. Os heterodi- ou heteromultímeros individuais agregados no bi- ou oligômero podem ser igualmente iguais ou diferentes, isto é, um bi- ou oligômero de acordo com a invenção pode compor-se eventualmente também de diferentes heterodi- ou -oligômeros.

Todavia, também é possível, que as proteínas de fusão sejam idênticas no respectivo di- ou multímero como subunidade do bi- ou oligômero, ao contrário, as subunidades individuais constituídas como di- ou multímero são diferentes no bi- ou oligômero (heterobi- ou heterooligômero de homodi-, -tri-, -tetra- ou -pentâmeros). Deste modo por exemplo, em um hexâmero de trímeros de acordo com a invenção, até seis diferentes homotrímeros com relação ao componente A podem ser associados. Desta maneira, pela escolha, disposição, a combinação específica e/ou pelo número

dos componentes A no bi- ou oligômero podem ser efetuadas tipicamente atividades biológicas finamente moduladas. Sabe-se, que certos efeitos biológicos somente pela combinação de pelo menos dois ligantes (no sentido biológico, não no sentido ampliado de acordo com a presente invenção) provocam o efeito biológico desejado, por exemplo, uma ativação celular. Isto é desejável, por exemplo, na combinação de certas interleucinas com relação ao seu efeito como ativadores de células T ou B. De acordo com a invenção, tais podem estar dispostas somente em combinação com efetores eficientes em um complexo de acordo com a invenção. Todavia, também é imaginável, que são preparadas combinações, que por exemplo, com relação ao seu respectivo componente A contêm os mais diferentes oligômeros.

Em uma outra forma de execução preferida trata-se no caso do componente A na proteína de fusão recombinante de um hormônio de peptídeo, de um fator de crescimento, de uma citoquina, de uma interleucina ou de um fragmento do mesmo, de preferência, de um fragmento capaz de ligação. Mas também derivados funcionais dos peptídeos e/ou das proteínas mencionados acima podem ser aplicados como componente A na proteína de fusão recombinante, que é componente de um oligômero de acordo com a invenção.

Como derivados funcionais de proteínas biologicamente ativas, fragmentos de proteínas ou peptídeos são mencionadas especialmente aquelas proteínas, que mantêm a função biológica, mas igualmente apresentam diferenças de seqüências para com as seqüências nativas correspondentes. No caso destes desvios de seqüências pode tratar-se de uma ou mais inserção(inserções), deleção (deleções) ou de substituição (substituições), sendo preferida uma homologia de seqüência de pelo menos 70 % e muito particularmente preferida uma homologia de seqüência de pelo menos 85 % entre o derivado aplicado e a seqüência nativa. Sob o termo dos derivados funcionais recaem especialmente aquelas seqüências de aminoácidos, que comparadas com as seqüências fisiológicas apresentam substituição conservadora. Como substituições conservadoras são denominadas aquelas substituições, nas quais os aminoácidos são trocados um pelo ou-

tro, que provêm da mesma classe. Há especialmente aminoácidos com cadeias laterais alifáticas, cadeias laterais carregadas positiva ou negativamente, grupos aromáticos nas cadeias laterais ou aminoácidos, cujas cadeias laterais podem realizar pontes de hidrogênio, por exemplo, cadeias laterais, que possuem uma função hidróxi. Isto significa, que por exemplo, um aminoácido com uma cadeia lateral polar é substituída por um outro aminoácido com uma cadeia lateral igualmente positiva ou por exemplo, um aminoácido caracterizado por uma cadeia lateral hidrófoba é substituída por um outro aminoácido com cadeia lateral igualmente hidrófoba (por exemplo, serina (treonina) por treonina (serina) ou leucina (isoleucina) por isoleucina (leucina)).

Por um ligante compreende-se no sentido da presente invenção todas as moléculas participantes de reações de ligação. No caso de um ligante pode tratar-se, por conseguinte, também de uma proteína normalmente denominada como receptor. Também um tal receptor pode ser "ligante" no sentido desta invenção, quando este liga em uma molécula de sinal.

De acordo com a invenção, são preferidos oligômeros de trímeros de proteínas de fusão recombinantes, especialmente tri- ou quatrômetros de trímeros (3 x 3 ou 4 x 3) ou hexâmeros de trímeros (6 x 3).

Particularmente prefere-se um bi- ou oligômero de um di-, tri-, tetra- ou pentâmero de proteínas recombinantes, quando o componente A na proteína de fusão recombinante é uma citoquina da família citoquina TNF, um fragmento de uma tal citoquina TNF ou um derivado funcional de uma citoquina TNF ou de um fragmento de citoquina TNF correspondente. Com isso, as citoquinas TNF aplicadas nas células alvo, devido à ligação aos receptores correspondentes, provocam por exemplo, efeitos apoptóticos, proliferativos ou ativadores. Em uma contagem não definitiva podem ser tomados em consideração como citoquinas TNF especialmente as proteínas CD40L, FasL, TRAIL, TNF, CD3 0L, OX40L, RANKL, TWEAK, Lta, Ltab2, LIGHT, CD27L, 41-BB, GITRL, APRIL, EDA, VEGI e BAFF. Como componente A na proteína de fusão recombinante aplicam-se com isso, de prefe-

rência, fragmentos extracelulares das citocinas TNF em posição de membrana mencionadas acima ou seus derivados funcionais. Estes produtos de dissociação são muito particularmente preferidos, quando sua funcionalidade biológica respectiva, especialmente seu poder de ligação permanece no respectivo receptor. Também derivados funcionais, no sentido mencionado acima, das citocinas TNF ou fragmentos das citocinas TNF mencionadas acima podem ser aplicados como componente A da proteína de fusão. Em uma forma de execução muito particularmente preferida, o componente A da proteína de fusão recombinante é escolhida do grupo, constituído de hFasL (AA 139-261), hTRAIL (AA 95-281), hCD40L (AA 116-261) e m ou hTNF α (AA 77-235).

Mas também receptores (receptores em posição de membrana ou intracelulares), especialmente receptores de proteínas da família das citocinas TNF, especialmente os receptores fisiológicos das citocinas TNF mencionadas acima ou fragmentos ou derivados dos receptores, são aplicados em uma forma de execução preferida como componente A na proteína de fusão recombinante. No caso, de serem aplicados fragmentos de receptores como componente A, tratar-se-á especialmente de fragmentos da sequência de proteínas fisiológicas destes receptores, que estão dispostos fisiologicamente extramembranosos. Aqui podem ser tomados em consideração de modo particularmente preferido os fragmentos extracelulares de tais receptores. Por exemplo, de acordo com a invenção, o(s) domínio(s) de ligação de um receptor, especialmente de um receptor, que liga uma citocina da família das citocinas TNF (por exemplo, FasR, CD30, CD40, GITR, TNF-R1 e/ou TNF-R2) pode/podem ser aplicado(s) sobre uma imunoglobulina dimerizadora (fragmento Fc dimerizador) e estes dímeros podem ser bi- ou oligomerizados novamente por um componente B, por exemplo, por um fragmento do tipo do colágeno com a capacidade de bi- ou oligomerizar di- ou multímeros em complexos bi- ou oligômeros de acordo com a invenção. Neste caso pode ser tomado em consideração, por exemplo, um tetrâmero de di- ou multímeros (por exemplo, por fragmentos tetramerizadores de ACRP30), um pentâmero de di- ou multímeros (por exemplo, pelos frag-

mentos de seqüências de um monômero do complexo COMP aplicados como componente B) ou também um hexâmero de di- ou multímeros (por exemplo, pelos fragmentos hexamerizadores de monômeros do complexo Clq).

5 De acordo com a invenção, resultam por conseguinte, as seguintes possibilidades: o componente A escolhido para uma proteína de fusão recombinante, que deve ser componente de um oligômero de acordo com a invenção, já se apresenta como tal em solução como di- ou multímero. O componente B em um tal caso só reforçará ainda a di- ou multimerização do componente A e essencialmente provocar a bi- ou oligomerização das proteínas de fusão recombinantes. Esta situação é encontrada, por exemplo, então, quando como componente A deve ser oligomerizado pelo menos um ligante TNF ou um fragmento ou derivado do mesmo, que já em solução são tipicamente trimerizados, como componente(s) de uma proteína de fusão. No caso, entretanto, de que o componente A como tal em solução não mostra nenhuma di- ou multimerização realizada pela ação recíproca superficial, o componente B terá que assegurar de acordo com a invenção tanto uma di- ou multimerização do componente A como também uma bi- ou oligomerização das proteínas de fusão recombinantes di- ou multimerizadas. 10 Isto é por exemplo, tipicamente necessário no caso, em que receptores ou fragmentos dos mesmos formam o componente A na proteína de fusão recombinante. 15 20

No âmbito da presente invenção, também são publicados bi- ou oligômeros de di-, tri-, tetra- ou pentâmeros de proteínas de fusão recombinantes, nos quais de preferência, o componente A é um antígeno ou um fragmento de um antígeno. É desejado, com isso, aplicar antígenos de causadores por vírus, bacterianos ou protozoológicos. Neste caso, pode tratar-se de antígenos típicos desejados de um causador, por exemplo, fragmentos de proteínas e/ou de estruturas de carboidratos específicos, tipicamente no entanto, de antígenos superficiais dos respectivos causadores ou então de 25 30 fragmentos de proteínas superficiais de causadores, que apresentam igualmente propriedades antigénicas. Seria imaginável, neste caso, por exemplo,

em uma contagem não definitiva de hemaglutinina, neuraminidase, PreS1, PreS2, antígeno HBs, gp120, gp41 ou também certos antígenos de tumores típicos.

No caso do componente A da proteína de fusão recombinante
5 pode tratar-se, porém, no caso de uma forma de execução preferida também de uma seqüência de aminoácidos, que é adequada para atuar como veículo para um agonista de receptor ou como antagonistas de receptor. Assim por exemplo, uma pequena molécula orgânica-química ativa como substância
10 ativa farmacológica, pode ser acoplada tipicamente covalente a uma tal seqüência de aminoácidos, por exemplo, sobre uma ligação éter na treonina ou serina, uma ligação do tipo de amida ou sobre uma ligação éster. Pela presente invenção são postos à disposição depois grandes complexos de oligômeros de, por exemplo, 18 proteínas de fusão (por exemplo, 3 x 6 proteínas de fusão) em cada caso com agonistas de receptores ou antagonistas
15 de receptores acoplados. Por este meio, pode ser obtido um considerável aperfeiçoamento da eficiência ou da afinidade de tais moléculas orgânicas-químicas em seus respectivos receptores, introduzidos em um veículo de proteína oligomérico, por exemplo, para a aplicação como medicamento na medicina humana ou veterinária.

20 No caso do componente B da proteína de fusão recombinante, que se apresenta di- ou multimerizada no bi- ou oligômero, tratar-se-á tipicamente de uma proteína da família das proteínas C1q ou de colectinas. As proteínas da família C1q ou colectina são particularmente preferidas como componente da proteína de fusão recombinante, a saber como componente
25 B então, quando somente sua seqüência de di-/multimerização ou bi-/oligomerização é transcrita ou transladada na proteína de fusão recombinante. Os domínios de "cabeça" na maioria das vezes globulares (figura 14), que estão contidos na seqüência dos monômeros nativos, portanto, não aparecerão como produtos de translação na proteína de fusão recombinante de
30 acordo com a invenção e são por isso, também não são componente do componente B no mesmo. O componente B mencionado acima em uma proteína de fusão recombinante de acordo com a invenção apresentará uma

seqüência, que apresenta tipicamente pelo menos sobrepondo a funcionalidade para a di-/multimerização ou bi-/oligomerização, pois os fragmentos das proteínas do tipo de colágeno aplicados como componente B das famílias mencionadas acima participam tipicamente da formação de por exemplo, hélices triplas, que possuem novamente a capacidade, de realizar com outras hélices triplas uma estrutura bi- ou oligômero (por exemplo, um tetrâmero ou hexâmero de por exemplo, hélices triplas).

Tipicamente por conseguinte, a proteína de fusão multi- ou oligomerizadora apresentará os domínios responsáveis pela di- e multimerização ou pela bi- ou oligomerização das proteínas das famílias das proteínas C1q ou colectinas como componente B, enquanto que seus domínios "de cabeça" respectivos são substituídos por outras proteínas ou fragmentos de proteínas que distinguem igualmente uma função biológica como componente A. O termo "proteína de fusão recombinante" no âmbito da presente invenção é compreendido, portanto, de modo tal, que pelo menos um componente A e pelo menos um componente B na proteína de fusão recombinante são fusionadas artificialmente, isto é, que uma proteína de fusão no sentido da presente invenção não corresponde a nenhuma proteína que aparece naturalmente.

Também derivados funcionais, isto é, bi- ou oligomerizadores de proteínas da família da proteína C1q ou da família das colectinas ou derivados de fragmentos das proteínas mencionadas acima podem ser aplicados como componente B para a agregação de proteínas de fusão recombinantes em bi- ou oligômeros. Com isso, por exemplo, o componente B conterá a seqüência da proteína Clq, MBP, SP-A ("lung surfactant protein A"), SP-D ("lung surfactant protein D"), BC (Bovines Serumconglutinin), CL43 (Bovines Collectin-43) e/ou ACRP30 ou a seqüência(s) de fragmentos bi- ou oligomerizadores de pelo menos uma das proteínas mencionadas acima ou também de derivados funcionais destas proteínas ou os fragmentos dos derivados funcionais. Preferem-se particularmente bi- ou oligômeros de proteínas de fusão recombinantes então, quando o componente B da proteína de fusão recombinante é um fragmento de proteína da proteína C1q ou da proteína

ACRP30, especialmente da variante humana ou de uma outra variante de mamífero, muito particularmente da variante murina, sendo que um tal fragmento de proteína respectivo não apresenta tipicamente nenhum domínio "de cabeça" globular da proteína nativa C1q ou ACRP30.

5 Como forma de execução muito particularmente preferida da presente invenção, apresentam-se aqueles bi- ou oligômeros de di-, tri-, tetra- ou pentâmeros de proteínas de fusão recombinantes, cujo componente B contém uma seqüência de aminoácidos, de acordo com a figura 6A (seqüência emoldurada, SEQ ID NO. 4) ou figura 6B (SEQ ID NO. 8) ou um derivado funcional desta seqüência de aminoácido(s) ou um fragmento desta seqüência(s). Com isso, pode tratar-se tipicamente de um fragmento da proteína mACRP30 (m: murina) com por exemplo, os aminoácidos 18 até 111 ou de um fragmento da variante humana (hACRP30) com por exemplo, os aminoácidos 18 até 108. Por conseguinte, especialmente pode ser posta à
10 disposição de acordo com a invenção uma proteína de fusão, cujos componentes A e B são de origem humana, de modo que podem ser excluídas eventuais imunoreações na aplicação terapêutica no homem.

 Especialmente preferidos são bi- ou oligômeros de di- ou multímeros destas proteínas de fusão, que apresentam seqüências de diferentes
20 organismos hospedeiros. Agregados de acordo com a invenção são muito particularmente preferidos, quando estes se provêm de proteínas de fusão quiméricas, em que o componente A se origina de uma outra espécie animal do que o componente B. Deste modo pode ser vantajoso, que o componente A de uma seqüência de aminoácido do camundongo, rato, porco ou de um
25 outro vertebrado, especialmente de um mamífero ou de um derivado funcional do mesmo ou corresponde e o componente B é de origem humana ou vice-versa. Também são preferidos complexos de acordo com a invenção daquelas proteínas de fusão, cujo componente A corresponde a uma seqüência de um vírus, de bactérias ou de protozoários, combinados com um
30 componente B de origem humana. Naturalmente, as seqüências do componente A e do componente B podem originar-se em uma proteína de fusão de acordo com a invenção, mas também, da mesma espécie animal.

Em uma outra forma de execução preferida da presente invenção, a multi- e/ou oligomerização das proteínas de fusão é efetuada por uma seqüência de aminoácidos curta com mais de 6 aminoácidos, de preferência, de 8 até 20 aminoácidos, que está presente nas proteínas de fusão recombinantes como componente B. Esta bi- ou oligomerização de proteínas de fusão obtida tipicamente por estas seqüências de aminoácidos curtas, que já como tais não se apresentam por estruturas supersecundárias, mas por interação superficial em solução como di- ou multímeros, baseia-se de preferência, na formação de pontes de dissulfeto, que é possível pela seqüência de aminoácidos específica na proteína de fusão recombinante. Isto significa, que o componente B apresenta preferentemente pelo menos uma cisteína, que pode formar depois sob condições oxidantes uma ligação covalente com pelo menos uma cisteína de uma proteína de fusão de pelo menos um outro di- ou multímero. No caso preferido, de que o componente B contém uma seqüência de aminoácido bi- ou oligomerizadora curta de 8 até 20 aminoácidos, seria mencionada como exemplo a seqüência de aminoácido (código de uma letra) VDLEGSTSNRQCAGIRL. Esta seqüência que abrange 18 aminoácidos apresenta na posição 11 um radical cisteína, que pode formar uma ponte dissulfeto entre os di- ou multímeros.

Também derivados funcionais ou fragmentos desta seqüência que abrange estes 18 aminoácidos podem ser aplicados como componente B. Neste caso, menciona-se especialmente a seqüência VDLEGSTSNRQSA-GIRL, na qual na verdade, na posição 11 o radical cisteína é substituído por um radical serina, mas que pode assegurar igualmente uma bi- ou oligomerização dos multímeros da proteína de fusão.

As proteínas de fusão podem ser constituídas em uma forma de execução preferida também de modo tal, que através da bi- ou oligomerização de proteínas de fusão di- ou multimerizadas podem ser formados agregados de ordem superior. Estes agregados de ordem superior, que abrangem novamente dois ou mais bi- ou oligômeros, podem ser postos à disposição por exemplo, pela reticulação sobre anticorpos. Os anticorpos estão voltados contra epitopos sobre a(s) proteína(s) de fusão de um complexo de

acordo com a invenção, de preferência, contra um epitopo do componente B. Mas também a proteína de fusão pode apresentar além dos componentes A e B fragmentos de seqüências adicionais, que servem como antígenos para o anticorpo reticulador. No âmbito da presente invenção preferem-se neste
5 contexto as chamadas seqüências Tag, por exemplo, um Flag-Tag, isto é, a seqüência de aminoácido DYKDDDDK ou então também por exemplo, um His-Tag (contendo várias histidinas consecutivas).

Mas de modo muito particularmente preferido preparam-se no âmbito da presente invenção agregados de ordem superior pelo fato, de es-
10 tar contido mais do que um componente B na proteína de fusão recombinante. De preferência, por conseguinte, para a formação de agregados de ordem superior a proteína de fusão conterá um componente B1 para a formação de bi- ou oligômeros e, além disso, pelo menos um outro componente B (por exemplo, um componente B2), que é tipicamente diferente do compo-
15 nente B1. O componente B2, que tem que aparecer pelo menos em uma proteína de fusão de um bi- ou oligômero de acordo com a invenção, assegura, que os bi- ou oligômeros se reticulam e agregados de ordem superior. Por exemplo, no caso do componente B1 pode tratar-se de um fragmento bi- ou oligomerizador de uma proteína da família das proteínas C1q- ou colecti-
20 na, enquanto que o componente B2 é uma seqüência com comprimento de 8 até por exemplo, 28 aminoácidos formadora de pelo menos uma ponte dissulfeto. No caso, de ser formada pelo menos uma ponte dissulfeto entre dois diferentes oligômeros, é posto à disposição um agregado de acordo com a invenção de ordem superior, por exemplo, um bímero de um oligômero.

25 Além disso, será preferido, introduzir entre o componente A e o(s) componente(s) B ou, caso estejam contidos vários componentes B na proteína de fusão, também entre estes pelo menos dois componentes B as chamadas seqüências ligadoras. Estas seqüências ligadoras servem para a separação estrutural dos diferentes componentes funcionais na proteína de
30 fusão recombinante e podem assumir, de preferência, também uma função de "dobradiça", isto é, representar uma seqüência de aminoácido de estrutura flexível.

Com isso, são publicados de acordo com a invenção de modo muito geral bi- ou oligômeros ou agregados de ordem superior, que se destacam especialmente por uma maior eficácia biológica e/ou por maiores afinidades nas proteínas complementares. Desta maneira, publicam-se pre-

5 sentemente como outro objeto da invenção também processos, que servem para aumentar a eficácia biológica e/ou para aumentar a afinidades de biomoléculas ou fármacos com função de ligantes no sentido da presente invenção. Tais processos destacam-se pela recombinação de pelo menos um

10 componente A, que corresponde a uma proteína ou a fragmentos de proteína com função biológica, com pelo menos um componente B di- ou multimerizador e bi- ou oligomerizador, sendo obtido um aumento da atividade biológica e/ou um aumento da afinidade do componente A pelo fato, de que as proteínas de fusão recombinantes são bi- ou oligomerizadas, em seguida, pela multi- ou oligomerização em bi- ou oligômeros de di- ou multímeros. O

15 processo é muito particularmente preferido então, quando o componente A é uma citocina TNF, um fragmento de uma citocina TNF ou um derivado funcional de uma tal proteína ou fragmento de proteína. Um outro processo preferido é a recombinação de pelo menos um componente A com pelo menos um componente B em uma proteína de fusão recombinante, sendo que

20 pelo menos um componente A é um receptor ou fragmento de um receptor, de preferência, de um receptor TNF. Com relação a formas de execução preferidas de um tal processo de acordo com a invenção, valem analogamente as formas de execução preferidas descritas acima para os bi- ou oligômeros de acordo com a invenção.

25 Os bi- ou oligômeros da presente invenção são tomados em consideração para a preparação de um medicamento ou para o tratamento de doenças ou distúrbios para o emprego medicinal, isto é, tanto para a medicina humana como também para a medicina-veterinária. Também os agregados de ordem superior formados de acordo com a invenção a partir de bi-

30 ou oligômeros prestam-se para a aplicação como medicamentos ou para a preparação de um medicamento. Um outro espectro de doenças ou distúrbios pode ser tratado com os bi- ou oligômeros reivindicados de acordo com a

invenção ou com os agregados de ordem superior. Em nenhuma enumeração de modo algum definitiva tais bi- ou oligômeros ou agregados de ordem superior podem ser aplicados para a preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios hiperinflamatórios, doenças auto-imunes, doenças, 5 que se baseiam em reações hiper- ou hipoapoptóticas, doenças neurodegenerativas, mas também para o tratamento de doenças infecciosas, doenças de tumores e/ou distúrbios endocrinológicos. Entre as doenças infecciosas menciona-se a administração de bi- ou oligômeros nas infecções bacterianas ou por protozoários, mas especialmente nas infecções virais, sendo 10 particularmente preferidos como componente A na proteína de fusão recombinante, então, anticorpos ou fragmentos de anticorpos portando parátomos. Bi- ou oligômeros ou seus agregados de ordem superior são então muito particularmente adequados, quando a doença torna necessário um tratamento com citocinas biologicamente ativas, por exemplo, também para o 15 tratamento ou para a preparação de um medicamento para o tratamento de tumores, especialmente de tumores do sistema linfático.

Além disso, o emprego de bi- ou oligômeros de acordo com a invenção será aplicado como vacinas ou para a preparação de uma vacina para a imunização ativa ou passiva contra doenças infecciosas. Neste caso, 20 aplica-se como componente A na proteína de fusão recombinante tipicamente um antígeno adequado para a vacinação no caso da imunização ativa. Para este fim, oferecem-se especialmente antígenos superficiais ou fragmentos de antígenos superficiais de bactérias, vírus ou protozoários, por exemplo, de plasmódios ou tripanossomas. Em uma enumeração não-finalizante pode ser empregada uma vacina, que contém bi- ou oligômeros 25 ou agregados dos mesmos, sendo que as proteínas de fusão recombinantes apresentam pelo menos um componente A, isto é, um ou mais antígeno(s) iguais ou diferentes dos causadores, para a vacinação contra rubéola, sarampo, poliomielite, raiva, tétano, difteria, BCG, tuberculose, malária, febre amarela, HIV ou vírus da gripe, por exemplo, rinovírus. Também a combinação 30 de diferentes antígenos em um bi- ou oligômero ou em um agregado de ordem superior de bi- ou oligômeros é possível de acordo com a invenção,

sendo que diversos antígenos do mesmo causador em um bi- ou oligômero ou então antígenos de dois ou mais causadores em um bi- ou oligômero ou em um agregado de ordem superior podem ser combinados. Tipicamente para este fim, dois ou mais componente A1, A2 até AX podem estar contidos em uma proteína de fusão, que é então componente de um bi- ou oligômero de acordo com a invenção ou de um agregado de ordem superior ou então duas ou mais proteínas de fusão diferentes com relação a pelo menos um componente A em um bi- ou oligômero ou agregado de ordem superior podem ser combinados através de pelo menos um componente B.

10 De preferência, pelo menos dois diferentes tipos de bi- ou oligômeros de acordo com a invenção, também podem estar contidos em uma composição para o emprego como medicamento ou como vacina ou para sua preparação.

Em uma outra forma de execução de acordo com a invenção, o
15 componente A em uma proteína de fusão de acordo com a invenção, é um imunomodulador, por exemplo, uma interleucina (IL), especialmente IL-2.

Além disso, no âmbito da presente invenção também é publicado o emprego de bi- ou oligômeros de acordo com a invenção como adjuvante de imunização e/ou de vacinação. Sabe-se, que muitos antígenos administrados para a imunização em cobaias só causam uma resposta imunológica insuficiente. Tais adjuvantes podem ser tomados em consideração como componente A em uma proteína de fusão de acordo com a invenção e, com isso, como componente de um bi- ou oligômero de acordo com a invenção. Por exemplo, o componente A pode conter uma seqüência de aminoácido do ligante CD40 (CD40L) ou a seqüência ou um fragmento de seqüência de uma interleucina, por exemplo, um da interleucina 1 até 12. O objetivo fisiológico de CD40L é controlar a passagem de uma célula B em repouso para o ciclo da célula. Em um complexo bi- ou oligomerizado de acordo com a invenção, também podem ser combinadas interleucinas, por exemplo, IL-4,
25 IL-5, IL-6 e/ou CD40L (diversas proteínas de fusão recombinantes em um bi- ou oligômero) ou elas podem aparecer como componentes de uma composição (pelo menos dois diferentes tipos de bi- ou oligômeros, que podem ser
30

formados em cada caso de proteínas de fusão idênticas ou diferentes), que tipicamente além do(s) imunógeno(s) contém pelo menos um, de preferência, dois ou mais tipos de bi- ou oligômeros de acordo com a invenção.

Os bi- ou oligômeros ou também agregados de ordem superior de uma tal composição podem ser formados a partir de proteínas de fusão idênticas ou diferentes com relação ao(s) componente(s) A. Neste caso, como componente A pode ser tomada em consideração qualquer seqüência fisiológica com propriedades co-estimuladoras e/ou ativadoras do sistema imunológico (resposta imunológica celular ou humoral). Com isso, pode tratar-se neste caso de compostos fisiológicos ou de compostos sintéticos. Com isso, também são publicadas, portanto, composições, que contêm um ou mais tipo(s) de bi- ou oligômeros de acordo com a invenção além de um ou mais imunógeno(s), sendo que um tipo de bi- ou oligômero de acordo com a invenção pode ser constituído de preferência, de modo tal, que em um tal complexo bi- ou oligomerizado está contido mais do que um imunomodulador/adjuvante de imunomodulador, isto é, isto é, há um heterobi- ou -oligômero. Eventualmente um heterobi- ou -oligômero de acordo com a invenção, também pode reunir tanto uma ou mais proteínas de fusão com um imunógeno como componente A como também pelo menos uma proteína de fusão com um componente adjuvante como componente A, por exemplo, CD40L. Também são imagináveis duas ou mais diferentes proteínas de fusão em cada caso com diferentes componentes adjuvantes ou imunomoduladores em um heterooligômero de acordo com a invenção. Com isso, publica-se também o emprego de tais homo- ou heterooligômeros ou de composições, que contêm pelo menos um tipo de hetero- ou homooligômero de acordo com a invenção, com medicamento ou como vacina na medicina humana ou veterinária.

Os bi- ou oligômeros são aplicados no âmbito da presente invenção de preferência, de modo tal para a preparação de um medicamento ou para o tratamento das doenças ou distúrbios mencionados acima, que eles são adequados para a administração parenteral, isto é, por exemplo, subcutânea, intramuscular ou intravenosa ou oral ou intranasal. A adminis-

tração de bi- ou oligômeros ou agregados dos mesmos como vacina ou com base para a preparação de uma vacina é igualmente efetuada de preferência, em uma forma de administração parenteral ou oral, mas eventualmente também intranasal.

5 Os bi- ou oligômeros ou os agregados de ordem superior de acordo com a invenção, pode servir apenas como medicamentos ou serem aplicados para a preparação de um medicamento. Mas eles também podem ser aplicados em combinação com outros componentes de substâncias ativas ativos como medicamento. Os bi- ou oligômeros ou os agregados de
10 ordem superior de acordo com a invenção, também podem ser combinados em combinação com veículos, substâncias auxiliares e/ou substâncias aditivas aceitáveis farmacologicamente. Processos de preparação correspondentes são publicados em "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980), que é componente da publicação da presente invenção. Para a administração parenteral podem ser tomados em consideração
15 como veículos por exemplo, água estéril, soluções de cloreto de sódio estéreis, polialquilenoglicóis, naftaleno hidrogenado e especialmente polímeros de lactida biocompatíveis, copolímeros de lactida/glicolida ou copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

20 Bi- ou oligômeros ou agregados correspondentes de ordem superior de acordo com a invenção, também são aplicados de preferência, no setor do diagnóstico *in vitro* ou então por exemplo, para processos de purificação bioquímicos. Deve-se imaginar a aplicação de bi- ou oligômeros ou de agregados de ordem superior dos mesmos em colunas de purificação, que
25 podem ser embalados com tais complexos. Para isso, no âmbito da presente invenção, o emprego de tais complexos também é publicado para fins de comprovação.

Além disso, no âmbito da presente invenção são publicados processos, para preparar proteínas associadas especificamente, que em virtude
30 de suas ações recíprocas interagem na superfície da proteína e, por isso, se apresentam di- ou multimerizadas como tais em solução. Especialmente nas citocinas TNF ou em fragmentos preferentemente solúveis de tais citocinas

nas, que trimerizam em solução, é desejável, pô-las à disposição em uma determinada estequiometria em uma fração pura. No caso de uma simples coexpressão de diferentes proteínas capazes de associação entre si, por exemplo, de três citocinas TNF diferentes ou fragmentos diferentes de tais

5 citocinas TNF, todas as possíveis divisões das proteínas co-expressas encontram-se mesmo nos trímeros associados após a expressão, isto é, por exemplo, os trímeros desejados das proteínas P1,P2 e P3, mas também trímeros de duas proteínas P1 e de uma proteína P3 e outros.

Oligômeros de acordo com a invenção, podem ser aplicados,

10 agora de acordo com o processo, para obter determinados heteromultímeros desejados por exemplo, heterotrímeros de citocinas TNF ou fragmentos destas citocinas TNF. Para isso, são construídas diversas proteínas de fusão e de preferência, expressas em uma célula hospedeira. As proteínas de fusão aqui expressas apresentam como componente B fragmentos de se-

15 quências daquelas proteínas, que formam homooligômeros de heteromultímeros, isto é, por exemplo, formam um trímero de três diferentes cadeias bi- ou oligomerizadas. De preferência, estes componentes B nas proteínas de fusão correspondem a fragmentos de seqüências de proteínas da família do complemento ou colectina, por exemplo, Clq, que forma homohexâmeros de

20 heterotrímeros. Em uma proteína de fusão, portanto, combina-se como componente B um fragmento de seqüência, que prevê a proteína nativa para a multimerização de uma cadeia no heteromultímero, com um componente A, por exemplo, com uma citocina TNF, enquanto outras proteínas de fusão (que devem aparecer no heterotrímero) apresentam em cada caso combina-

25 ções de um outro componente A, isto é, por exemplo, de uma outra citocina TNF ou um fragmento da mesma, em cada caso com um outro fragmento de seqüência presente na proteína nativa, por exemplo, proteína Clq, para a heteromultimerização.

De preferência, em uma célula hospedeira são expressas de

30 agora em diante as proteínas de fusão, que podem formar o heteromultímero. Os heteromultímeros juntam-se depois em homooligômeros, pois o componente B só pode oligomerizar heteromultímeros idênticos. De acordo com

a invenção, por exemplo, três diferentes proteínas de fusão podem ser expressas em cada caso com diferentes componentes A, isto é, de preferência, com diferentes citocinas TNF, que são combinadas em cada caso ou com a cadeia alfa, beta ou gama multi- ou oligomerizadora de Clq. Nos oligômeros associadores encontram-se depois exclusivamente heteromultímeros, que apresentam todas as três citocinas TNF. Heteromultímeros com outra estequiometria, ao contrário, não aparecem. Apenas pela escolha das proteínas de fusão pode obter-se com isso, de acordo com a invenção, um produto específico em sua estequiometria e não susceptível a uma divisão estatística.

Além disso, prefere-se a aplicação daquelas proteínas de fusão ou processos para a obtenção de heteromultímeros de estequiometria indicada, que apresentam um ligante entre o componente A e o componente B. Os ligantes são muito particularmente preferidos então, quando eles contêm pelo menos um ponto de interseção proteolítico, que permite separar os componentes A do complexo homooligômero (de heteromultímeros) dos componentes B. Com isso, obtém-se finalmente uma fração, que é constituída exclusivamente do heteromultímero desejado, por exemplo, de um heterotrímero de três citocinas TNF diferentes. No caso do ponto de interseção proteolítico no ligante trata-se de preferência, de uma sequência de consenso de trombina.

Como outrivo objeto da presente invenção, descrevem-se proteínas de fusão em questão, que são adequadas para a bi- ou oligomerização de di- ou multímeros, desde que a proteína de fusão recombinante contenha pelo menos um componente A e pelo menos um componente B, sendo que o componente A contém uma proteína ou um fragmento de proteína com função biológica, especialmente com função ligadora para anticorpos ou receptores ou então um anticorpo ou fragmento de um anticorpo e o componente B contém um fragmento di- ou multimerizador e bi- ou oligomerizador ou um derivado funcional de um tal fragmento de uma proteína, escolhida do grupo, constituído da família das proteínas C1q ou das colectinas. Muito particularmente preferem-se tais proteínas de fusão então, quando o compo-

nente B da proteína de fusão recombinante contém um fragmento multi e/ou oligomerizador da proteína Clq, SP-A, SP-D, BC, CL43 e ACRP30. Também pode ser aplicado um derivado funcional de um tal fragmento das proteínas mencionadas acima no âmbito da presente invenção. Uma proteína de fusão
5 conterá neste caso, além de um componente A dotado de atividade biológica, tipicamente um componente B, que apresenta exclusivamente o fragmento das proteínas mencionada acima responsável para a agregação, mas de preferência, não o domínio "de cabeça" globular.

Como componente B de uma proteína de fusão de acordo com a
10 invenção, pode ser tomado em consideração, de preferência, também uma sequência, que contém a sequência de aminoácido do domínio do colágeno oligomerizante do ligante EDA, especialmente a variante de um mamífero, muito particularmente a variante humana, sem um fragmento oligomerizante ou derivado funcional de um tal domínio. De modo muito particularmente
15 preferido aplica-se como componente B um fragmento de sequência, que contém os aminoácidos 160 até 242 da proteína humana EDA ou um derivado funcional, por exemplo, de um fragmento. De preferência, tratar-se-á de um hexâmero.

Um outro objetivo da presente invenção são sequências de
20 DNA, que codificam para proteínas de fusão do tipo mencionado acima. Tais sequências de DNA são expressas em vetores de expressão, sendo que também os vetores de expressão correntes, que contêm uma sequência de DNA para as proteínas de fusão de acordo com a invenção, são objetivo da invenção. Além disso, incluem-se na presente invenção aquelas células
25 hospedeiras, que são transfectadas com sequências de DNA, que codificam para proteínas de fusão de acordo com a invenção. Neste contexto são muito particularmente preferidas células hospedeiras, que são transfectadas com vetores de expressão, em que os vetores de expressão contêm novamente sequências de DNA, que codificam para as proteínas de fusão de
30 acordo com a invenção.

Um outro objetivo da presente invenção são receptores, especialmente receptores, que ligam ligantes de moléculas de sinal da família das

citoquinas TNF, que se apresentam di- ou multimerizadas. Assim por exemplo, um tal receptor, um derivado do mesmo ou um fragmento de um receptor ou derivado, especialmente um fragmento, que abrange a região extracelular do receptor, onde novamente são preferidos o(s) domínio(s) de ligação, podem apresentar-se como componente A de uma proteína de fusão, que é componente de um di- ou multímero. A dimerização pode ser obtida pela recombinação com fragmentos de imunoglobulinas, especialmente fragmentos Fc, enquanto que a multimerização pode ser obtida, por exemplo, após recombinação com os domínios de multimerização correspondentes. Para isso, prestam-se por exemplo, todos os fragmentos de seqüências de proteínas, que geram di- ou multímeros através da formação de estruturas supersecundárias, por exemplo, "Coiled-Coil-Helices" ou hélices triplas do tipo de colágeno típicas (por exemplo, CMP, COMP, colágeno, laminina). Também fragmentos de proteínas da família C1q ou de colectinas são tipicamente adequados para uma di- ou multimerização de receptores ou de fragmentos de receptores. Assim aproximadamente, por exemplo, o fragmento extracelular de um membro da família de receptores TNF, por exemplo, o receptor Fas (FasR) pode ser expresso como componente A na forma de um pentâmero mediante recombinação com os domínios de pentamerização correspondentes de COMP como componente B. Com isso, pode tratar-se neste caso de homo- ou heterodi- ou -multímeros de proteínas de fusão, que apresentam um receptor ou fragmento de receptor.

Estes di- ou multímeros de uma proteína recombinante com um componente A contendo um receptor ou fragmento de receptor também podem ser tomados em consideração como medicamento ou para a preparação de um medicamento. Seu emprego é especialmente indicado, quando aparecem altas concentrações extracelulares dos ligante de receptor correspondentes em um quadro de doença. Neste caso, também pode tratar-se de maiores concentrações de moléculas de sinal em posição de membrana, por exemplo, citoquinas TNF, sobre as próprias células ou de moléculas de sinal solúveis. O emprego de tais multímeros, porém, fundamentalmente também é sempre desejado, quando a ativação de uma cadeia de transdução de si-

nal, que é solta no receptor tipicamente em posição de membrana correspondente, deve ser impedida ou reduzida pela aplicação de di- ou múltiplos de acordo com a invenção solúveis, exógenos, que aprisionam as moléculas de sinal, constituídos de proteínas de fusão, que contêm como componente A um receptor ou um fragmento de receptor.

A presente invenção é elucidada mais detalhadamente pelas figuras abaixo:

Na figura 1 (SEQ ID NOs: 1 e 2) no código de uma letra está representada a sequência de aminoácido de uma proteína de fusão (2) de acordo com a invenção recombinante que aparece em um oligômero de acordo com a invenção (hexâmero FasL), isto é, um bîmero de um trímero. Como componente A denomina-se um fragmento de sequência do hFasL (AS 103 ou 139 até 281), enquanto que como componente B aparece o ligante específico (bimerizador no resultado) com a sequência VDLEGSTSNGRQ-CAGIRL. Além disso, encontra-se na figura 1 a sequência de aminoácido da proteína de fusão recombinante (1), que correspondentemente ao estado da técnica só aparece como componente de um trímero FasL, isto é, nenhuma apresenta o presente múltímero, aqui trímero, componente B bi- ou oligomerizante. Os fragmento das duas proteínas de fusão (1) e (2) recombinantes são caracterizados na figura 1 acima dos dados da sequência com relação a sua respectiva funcionalidade.

A figura 2 abrange na figura 2A o resultado de uma eletroforese de gel (SDS-PAGE) de proteínas de fusão (2) de acordo com a invenção, isto é, com a sequência ligante específica (componente B), sob condições redutoras (r) e não-redutoras (nr). Sob as condições não-redutoras em solução o oligômero elui de acordo com a invenção com complexo nativo de seis polipeptídeos de acordo com a invenção (proteínas de fusão (2)), pois de acordo com a invenção, ocorre formação de uma ponte de dissulfeto entre os componentes B de duas proteínas de fusão (2) de acordo com a invenção, que em cada caso são componente de diversos trímeros. No resultado, um oligômero de acordo com a invenção, apresenta-se por conseguinte como hexâmero FasL com um peso molecular, que corresponde aproximada-

mente ao peso molecular sêxtuplo da proteína de fusão (2) de acordo com a invenção em forma monômera. Quando são dadas condições desnaturantes (por exemplo, sobre SDS-PAGE), as proteínas de fusão migram na ausência de agentes de redução como dímeros, condicionados pela formação de uma

5 ponte de dissulfeto entre dois monômeros. Sob condições redutoras e desnaturantes, os monômeros da proteína de fusão (2) de acordo com a invenção, migram, ao contrário, no gel SDS. Esquemáticamente na figura 2B está representado um oligômero de acordo com a invenção, aqui um bímérico de um trímero, de uma proteína de fusão de acordo com a invenção, por exemplo,

10 uma proteína de fusão (2), tal como mostrado na figura (1).

Na figura 3 é apresentado o resultado de um ensaio citotóxico em função das concentrações de trímeros FasL (trímero de três proteínas de fusão pelo estado da técnica, por exemplo, proteína de fusão (1) de acordo com a figura 1, que não apresentam nenhum componente B) ou do bímérico

15 FasL (hexâmero como bímérico de trímeros) de acordo com a invenção, ilustrado esquematicamente na figura 2B, na presença (■, ▲) ou ausência (□, Δ) de anticorpos anti-flag M2 para células A20 ou células Jurkat. A densidade óptica em 490 nm é uma medida para a capacidade de vida das células (alta densidade óptica corresponde a um pequeno efeito apoptótico das

20 substâncias acrescentadas e, com isso, a uma alta capacidade de vida das células). Sobre células A20 (figura 3A e 3B) e sobre células Jurkat (figura 3C e 3D) o efeito apoptótico dos bímicos FasL de trímeros (hexâmeros) de acordo com a invenção (figura 3B e 3D, em cada caso Δ) é aumentado em comparação com o efeito dos trímeros FasL de proteínas de fusão sem um

25 componente B bi- ou oligomerizante (estado da técnica, figura 3A e 3C, em cada caso (desenhar um quadrado, página 30) em 3 até 10 vezes. No acréscimo adicional de anticorpos anti-flag, que estão voltados contra a sequência flag das proteínas de fusão (1) e (2) de acordo com a figura 1 e pela reticulação por exemplo, também aumentam mais o grau de oligomerização

30 das proteínas de fusão de acordo com a invenção, a atividade apoptótica é aumentada em todos os preparados (figuras 3A até 3D, em cada caso ■ ou ▲).

Na figura 4 (SEQ ID NO: 3) está representada a seqüência de aminoácido de uma proteína de fusão (3) de acordo com a invenção, considerando-se a substituição (C → S) na região do ligante específico (componente B da pro proteína de fusão (3)) ("Super-FasL"). Ademais, faz-se referência à descrição com relação a figura 1. Através de experimentos de filtração de gel mostrou-se, que "Super-FasL" em solução em uma forma bimerizada de acordo com a invenção, apresenta-se como hexâmero. Por condições desnaturantes sobre SDS-PAGE as proteínas de fusão (3) de acordo com a invenção, também na ausência de agentes de redução, migram como monômeros, pois na região do ligante não se pode formar nenhuma ponte de dissulfeto com base na substituição dos aminoácidos C → S.

A figura 5 mostra analogamente a figura 3 a capacidade de vida de células A20 (figura 5B) ou células Jurkat (figura 5D) após adição de agregados de acordo com a invenção da proteína de fusão (3) de acordo com a invenção de acordo com a figura 4 ("Super-FasL") na presença (●) ou na ausência (o) de anticorpos anti-flag M2. As proteínas de fusão (3) de acordo com a invenção, provocam um efeito apoptótico aproximadamente pelo menos 1000 vezes reforçado em comparação com os trímeros FasL aplicados para comparação de acordo com o estado da técnica sem componente B bi- ou oligomerizador (figura 3A (células A20) e figura 3C (células Jurkat)). A adição de anticorpos anti-flag M2 (●) tem o poder de aumentar por ampla oligomerização de "Super FasL" em agregados de acordo com a invenção de ordem superior tanto sobre células A20 como também sobre células Jurkat a atividade apoptótica em comparação com o preparado sem anticorpo anti-flag insignificamente, aproximadamente 2 vezes, de preferência, pelo menos 1,5 vez (figura 5B e 5D). Disto resulta, que o grau de oligomerização (aqui como bímero de trímeros) provocado pelo ligante específico de uma proteína de fusão (3) de acordo com a invenção empregado com componente B, para a solução de apoptose, eventualmente pela oligomerização sobre a superfície da célula, já é quase ótimo e pelos agregados de ordem superior de acordo com a invenção, ainda pode ser insignificamente aumentado.

Na figura 6A (SEQ ID NO: 4) é mostrada a seqüência de amino-

ácidos de uma proteína de fusão (4) de acordo com a invenção, FasL-ACRP30, sendo que a proteína de fusão (4) (na continuação do terminal N para C) apresenta uma sequência flag, uma sequência ligadora como componente B, os aminoácidos 18 até 111 da proteína mACRP30 (m: murino), o
 5 ligante LQ e depois os aminoácidos 139 até 281 de hFasL como componente A.

Na figura 6B (SEQ ID NO: 8) é apresentada outra proteína de fusão. Esta abrange o domínio do colágeno do ligante ACRP30 humano (hACRP30, com os aminoácidos 18 até 111), sendo que seu terminal N é
 10 fusionado em uma marcação flag (DYKDDDDK) e seu terminal C no domínio extracelular de FasL humano (AS 139 até 281). Entre o terminal C de hACRP30 e hFasL é introduzida uma sequência ligadora (MHVD) igualmente como entre a marcação flag e o terminal N de hACRP30 (GPGQVQLQ). Todos os dados acima referem-se ao chamado código de uma letra dos ami-
 15 noácidos.

Figura 6C representa decursos de curvas, que resultam da titulação das células T Jurkat por um lado com FasL e por outro lado da proteína de fusão hACRP30 / FasL com adição de anticorpos anti-flag M2 (+) e sem adição de anticorpos anti-flag M2 (-). Para isso, sobrenadantes (OPTI-
 20 MEM) de células 293 transfectadas transientes com FasL ou hACRP30/FasL e que exprimem estas proteínas foram colocadas nas células T Jurkat. Em experimentos subseqüentes aplicaram-se para isso as concentrações decrescentes, descritas sobre o eixo x da figura 6C e a respectiva cota de sobrevivência das células Jurkat foi determinada com o teste de citotoxicidade
 25 padrão descrito em outro local. Da aplicação é evidente, que FasL é inativo sem anticorpos M2 de reticulação cruzada (♦) e somente o efeito de reticulação cruzada do anticorpo M2 provoca efeitos citotóxicos. Em consequência disto, o efeito correspondente de uma proteína de fusão de acordo com a invenção, a saber hACRP30 / FasL, já é mostrada sem adição de anticorpos
 30 M2 (▲). A adição de anticorpos M2 pode aumentar quase nada o efeito da proteína de fusão de acordo com a invenção.

Figura 7 mostra analogamente a figura 3 a vitalidade de células

BJAB após adição de trímeros FasL não capazes de bi- ou oligomerização (ensaio comparativo, à base da proteína de fusão (1) de acordo com a figura 1; figura A) e dos oligômeros de acordo com a invenção, aqui como tetrâmeros de trímeros, isto é, dodecâmeros, da proteína de fusão (4) de acordo com a invenção conforme a figura 6A na presença de ($\blacktriangle$) ou na ausência de ($\triangle$) de anticorpos anti-flag M2. Enquanto os trímeros FasL de acordo com a invenção na ausência de anticorpos que oligomerizam pela ligação à sequência flag não desenvolvem nenhum efeito apoptótico sobre células BJAB (figura 7A, ($\triangle$)), um dodecâmero de acordo com a invenção (tetrâmero de trímeros) de proteína de fusão (4) já induz em uma concentração de aproximadamente 10 ng/ml (K_{50} = 8 ng/ml) a morte da célula (figura 7B). Isto se manifesta nitidamente por uma redução do OD em 490 nm. Esta atividade apoptótica pode ser aumentada insignificamente pela adição de anticorpos anti-flag M2 a um preparado de dodecâmeros de acordo com a invenção, constituídos de proteínas de fusão FasL-ACRP30 de acordo com a invenção, isto é, um dodecâmero de acordo com a invenção, representa com relação à atividade apoptótica já um estado de agregação aproximadamente ótimo. A outra agregação solucionada por anticorpos correspondentes em agregados de ordem superior de acordo com a invenção, não tem o poder, ao contrário, de provocar outros efeitos biológicos significativos.

A sequência de aminoácidos de uma proteína de fusão (5) de acordo com a invenção, que contém os aminoácidos 95 até 281 da hTRAIL como componente A em combinação com o domínio de oligomerização de ACRP30 (AS 18-111) como componente B, é mostrada na figura 8 (TRAIL-ACRP30, SEQ ID NO: 5). De acordo com a invenção, a proteína de fusão (5) apresenta-se, por conseguinte, em solução como oligômero, a saber, com tetrâmero de trímeros.

Figura 9 representa a vitalidade de células Jurkat após adição de trímeros TRAIL (proteína de fusão com uma sequência flag no terminal N e dos aminoácidos 95 até 281 de TRAIL humano) pelo estado da técnica sem capacidade de bi- ou oligomerização (ensaio comparativo, figura 9A) e de dodecâmeros de acordo com a invenção da proteína de fusão de acordo

com a invenção (5), TRAIL-ACRP30, na presença (▲) ou ausência (Δ) de anticorpos anti-flag M2. As observações experimentais na figura 9 correspondem aos resultados ilustrados na figura 7. Enquanto os trimeros TRAIL na ausência de anticorpos que oligomerizam pela ligação na sequência flag não desenvolvem nenhum efeito apoptótico sobre as células Jurkat (figura 9A, (Δ)), o dodecâmero de acordo com a invenção da proteína de fusão (5) também neste experimento já induz a morte da célula em uma concentração de aproximadamente 100 ng/ml ($\approx K_{50}$) (figura 9b, (Δ)). A adição combinada de dodecâmeros TRAIL e anticorpos anti-flag pode formar, além disso, a partir dos oligômeros de acordo com a invenção pelo ulterior aumento do grau de oligomerização agregados de acordo com a invenção de ordem superior dos mesmos, que neste caso têm uma atividade (de pelo menos 10 vezes) que induz a apoptose mais aumentada (figura 9B, (▲)).

A sequência de aminoácidos de uma proteína de fusão (6) de acordo com a invenção, que contém os aminoácidos 77 até 235 do mTNF α (m: murino) como componente A em combinação com o domínio de oligomerização de mACRP30 (AS 18-111) como componente B e apresenta uma sequência flag com ligante na terminação N, é mostrada na figura 10 (TNF α -ACRP30). Com isso, a proteína de fusão (6) apresenta-se em solução como dodecâmero, a saber como oligômero (tetrâmero) de multímeros (trimeros).

Na figura 11 é mostrado o resultado de um experimento de proliferação celular. Neste caso, como medida para a proliferação celular de células CT6 determinou-se a incorporação de timidina $^3\text{[H]}$ nas células CT6 de camundongos como função da concentração de trimeros de uma proteína de fusão pelo estado da técnica (sequência flag e de ligação no terminal N com aminoácidos 77 até 235 seguintes de TNF α murino) sem um componente B, isto é, do trimero m TNF α (figura 11A) ou de dodecâmeros de acordo com a invenção (4x3) da proteína de fusão (6) de acordo com a invenção, conforme figura 10, do mTNF α -ACRP30 (figura 11B). A incorporação $^3\text{[H]}$ -timidina é representada em "cpm" ("counts per minute"). Os ensaios foram realizados na presença (▲) ou na ausência (Δ) de anticorpos anti-flag M2. Com isso, o trimero de mTNF α conhecido do estado da técnica após ligação ao receptor

TNF 2 (TNF-R2) tem somente um pequeno efeito proliferativo sobre as células CT6 (figura 11A, Δ). Somente após adição de anticorpos anti-flag ($\blacktriangle$) pelo seu efeito reticulador e, com isso, oligomerizante, pode ser observado um efeito proliferativo nitidamente aumentado.

5 Com relação a isso, oligômeros dos trómeros de acordo com a invenção, aqui o dodecâmero da proteína de fusão de acordo com a invenção (6), mostram na figura 11B um forte efeito proliferativo, que já pode ser observado em 5 ng/ml (Δ). A combinação de anticorpos anti-flag reticuladores e dodecâmeros de acordo com a invenção ($\blacktriangle$) como referência pode cuidar com relação a
10 isso, somente ainda um aumento significativo do efeito proliferativo em comparação com o resultado na adição isolada do dodecâmero de acordo com a invenção. Disto reconhece-se, que um oligômero de acordo com a invenção, aqui na forma de um dodecâmero, já provoca um efeito de proliferação quase ótimo.

A sequência de aminoácidos de uma proteína de fusão (7) de
15 acordo com a invenção, que contém os aminoácidos 116 até 261 do hCD40L (h: humano) como componente A em combinação com o domínio de oligomerização de ACRP30 (AS 18-111) como componente B, é apresentado na figura 12 (CD40L-ACRP30, SEQ ID NO: 7).

Na figura 13 - sensivelmente como na figura 11 - é apresentado
20 o resultado de um experimento de proliferação celular. Neste caso, foram empregados todavia - com diferença para a figura 11 - PBL humanos (linfócitos de sangue periféricos). É representado o efeito de CD40L tradicionais, que se apresenta em solução na forma de um trómero (sequência flag e ligante, tal com na figura 12, com sequência seguinte de AS 16 até 261 de
25 hCD40L sem um componente B oligomerizante; figura 13A), sobre a proliferação das células em comparação com o efeito de dodecâmeros de acordo com a invenção de proteínas de fusão de acordo com a invenção (7) de acordo com a figura 12, CD40L-ACRP30 (figura 13B). Os ensaios efetuados na ausência ($\square$) de anticorpos anti-flag M2 mostram, que o trómero CD40L
30 quase não tem efeito proliferativo, enquanto que na figura 13B já em concentrações bem inferiores de hCD40L é detectável uma efeito de proliferação correspondente. No eixo x encontra-se aplicado na figura 13B o tama-

nho "1/diluição", isto é, não-concentrações absolutas, pois foi acrescentado um sobrenadante enriquecido, cuja concentração absoluta é desconhecida. A combinação de anticorpos anti-flag reticuladores e dodecâmeros de proteína de fusão (7) de acordo com a invenção (▲) como referência pode pro-
 5 duzir pela formação de agregados de ordem superior uma outra mudança de um efeito de proliferação correspondente em menores concentrações.

A figura 14 representa esquematicamente a estrutura de múlti-
 meros oligomerizados. As figuras 14A e 14B mostram esquematicamente a
 aparência de "proteínas de feixes" nativas com sua estrutura já oligomeriza-
 10 da nativa (figura 14 A: hexâmero de trímeros de domínio de cabeça, que formam a proteína de complemento C1q; figura 14B: tetrâmero de trímeros de domínio de cabeça, que formam ACRP30, uma proteína de soro produzi-
 da por adipócitos). Com isso, no complexo C1q ou no complexo ACRP30 os domínios de cabeça dos monômeros nativos são multimerizados e oligome-
 15 rizados. Enquanto o complexo de oligomerização C1q é formado de três diferentes produtos genéticos, trata-se no caso do complexo de oligomerização ACRP30 do homododecâmero, isto é, de produtos genéticos multi- e oligomerizados idênticos. As cadeias de polipeptídeos individuais que se baseiam em cada caso nos dois complexos de oligomerização nativos men-
 20 cionados acima dispõem em cada caso de um domínio de cabeça, de uma faixa de seqüência, que pode formar uma hélice tripla de colágeno e de uma região de seqüência, que pode oligomerizar 6 (complexo C1q) ou 4 (comple-
 xo ACRP30) hélices triplas de colágeno, finalmente em um feixe de hélices de 18 ou 12 monômeros.

25 Na figura 14C está representado esquematicamente um múlti-
 mero oligomerizado de acordo com a invenção de uma proteína de fusão de acordo com a invenção (por exemplo, da proteína de fusão (4) de acordo com a figura 6A, FasL-ACRP30), que apresenta como componente A quatro
 ligantes TNF trimerizados (por exemplo, o ligante TNF FasL) ou fragmentos
 30 de ligantes TNF que oligomerizam pelas faixas de seqüência da proteína ACRP30 do tipo do colágeno como componente B, as quais se apresentam por exemplo, em uma proteína de fusão de acordo com a invenção, em um

homodecâmero de acordo com a invenção.

Figura 15A descreve a construção de uma outra proteína de fusão de acordo com a invenção, a saber hEDA/FasL. Neste caso, o domínio do colágeno de EDA humano (aminoácidos 160 até 242) serve como componente B, à qual no terminal N está acoplado através de um ligante um epitopo flag e terminal C, também através de um ligante, um componente A, na figura 15A FasL (AS 139-281, isto é, o domínio extracelular de FasL ou um fragmento do mesmo). A proteína de fusão hEDA/FasL de acordo com a invenção, apresenta-se como hexâmero, 2x3mer. No caso da proteína EDA trata-se de um outro membro da família TNF, que além de um domínio de transmembrana e de um domínio TNF também apresenta um domínio de colágeno (veja figura 15A acima) e na forma humana abrange AS.

A figura 15B apresenta experiência com a proteína de fusão hEDA/FasL de acordo com a invenção. Para a preparação da proteína de fusão inicialmente o domínio do colágeno de EDA humano (AS 160 até 242) foi amplificado com primers correspondentes e depois fusionada com as seqüências correspondentes no terminal N ou C para flag e os domínios extracelulares de FasL humano (AS 139 até 281). A figura 15B representa, agora, decursos de curvas, que resultam da titulação de células T Jurkat por um lado com FasL e por outro lado da proteína de fusão hEDA/FasL com adição de anticorpos anti-flag M2 e sem adição de anticorpos anti-flag M2. Para isso, sobrenadantes (OPTIMEM) de células 293 transfectadas transientes com FasL ou hEDA/FasL e que exprimem estas proteínas são colocados em células T Jurkat. Em experimentos subseqüentes aplicaram-se as concentrações decrescentes, representadas no eixo x da figura 15B das proteínas mencionadas acima e determinou-se a respectiva cota de sobrevivência das células Jurkat com auxílio do teste de citotoxicidade padrão descrito em outro lugar. Da aplicação torna-se nítido, que FasL é inativo sem anticorpo M2 reticulado cruzado () e neste caso somente o efeito reticulado cruzado do anticorpo M2 provoca efeitos citotóxicos (■). Com relação a isso, o efeito correspondente de uma proteína de fusão de acordo com a invenção, a saber hEDA/FasL, já é obtido sem a adição de anticorpos M2 (o). A adição de

anticorpos M2 ainda pode aumentar, neste caso, o efeito da proteína de fusão de acordo com a invenção (●).

A presente invenção é elucidada mais detalhadamente pelos exemplos de execução abaixo:

5 As ocasiões experimentais abaixo (a) até (f), desde que apropriadas, devem ser aplicadas para os seis exemplos de execução abaixo, e as modificações correspondentes reveladas acima não se aplicam:

(a) Construções de vetores para as proteínas de fusão FasL, TRAIL, Tnfr e CD40L:

10 Um fragmento de DNA que codifica para o peptídeo de sinal de hemaglutinina, inclusive 6 bases da seqüência não transportada na região 5' (CAA AAC ATG GCT ATC ATC TAC CTC ATC CTC CTG TTC ACC GCT GTG CG GGC) bem como o epitopo flag (GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA), o ligante (GGA CCC GGA CAG GTG CAG), os pontos de interseção de restrição PstI, Sall, XhoI e BamHI foram clonados entre os pontos
15 de interseção de restrição HindIII e BamHI de um vetor PCRIII modificado InVitrogen, NV Leek, Países Baixos), deletando-se as bases 720-769 (OS 038). Para o vetor de expressão do FasL trimérico os aminoácidos 139 até 281 da seqüência que codifica para o FasL humano, emoldurada pelos
20 pontos de interseção de restrição PstI e EcoRI, foi amplificada e clonada no vetor PCRIII modificado.

Para FasL hexâmeros a seqüência que codifica para aminoácidos 103 até 281, emoldurada dos dois lados por pontos de interseção EcoRI bem como adicionalmente na extremidade 5' da seqüência ligante GGCTT e
25 na extremidade 3' pelo códon Stop (TAA) e da seqüência natural, não transportada (GAG AAG CAC TTT GGG ATT CTT TCC ATT ATC ATT CTT TGT TAC AGG CAC CGA GAT GTT GAA GCC) foi clonada para o ponto de interseção EcoRI do vetor OS 038. O "super-FasL" (figura 4, proteína de fusão (3)) foi produzida pela introdução de uma mutação de ponto para a seqüên-
30 cia do ligante do vetor PS038, em que a seqüência CAGTGTGCTG foi substituída do lado 5' do local de interseção EcoRI por CAGTCTGCAG com auxílio de métodos de mutação PCR. Em seguida, o FasL (aminoácidos 103 até

281) foi clonado da maneira descrita acima no PS 038 modificado.

Para o TRAIL humano, TNF α murino e CD40L humano partes dos domínios extraceulares (TRAIL: aminoácidos 95 até 281, TNF α : aminoácidos 77 até 235, CD40L: aminoácidos 116 até 261) foram amplificados com pontos de interseção de restrição PstI na extremidade 5' e comum códon Stop bem como pontos de interseção de restrição SpeI e EcoRI na extremidade 3' por PCR e clonados para o vetor PCRII (Invitrogen). Para a expressão dos ligantes como trímeros são inseridos inicialmente a sequência GAT TAC AAA GAC GAT GAC GAT AAA, codificando para o flag-tag, bem como a sequência de ligante GGA CCC GGA CAG GTG CAG entre os pontos de inserção BamHI e PstI no vetor pQE-16 (Qiagen) (PS 330). Em seguida, os ligantes foram subclonados como fragmentos PstI/SpeI em PS 330.

O vetor de expressão para FasL-ACRP30 foi construído da seguinte maneira. Por meio do clone EST AA673154a sequência que codifica através de PCR para os aminoácidos 18 até 111 do ACRP30 murino, enquadrada pelos pontos de interseção de restrição NsiI e PstI foi clonado nos locais de interseção PstI do vetor codificador para FasL trímero (de modo tal, que o local de interseção NsiI/PstI fusionado estava do lado 5' da sequência codificadora). Os vetores para a expressão das proteínas de fusão das citocinas TNF restantes com ACRP30 foram obtidos pela substituição da sequência de FasL correspondente no vetor de expressão FasL-ACRP30 com a respectiva sequência de ligante nos pontos de interseção de restrição PstI e EcoRI.

(b) Expressão e purificação das proteínas recombinantes:

Para os TRAIL, TNF α e CD40L trímeros estabilizam-se clones estáveis em bactérias (cepa M15 com plasmídeo pRep4, Qiagen). Os respectivos clones foram pré-cultivados durante a noite em LB-Broth com ampicilina (100 μ g/ml) e kanamicina (50 μ g/ml) a 37°C e serviram para a inoculação da cultura principal (diluição 1:50, crescimento a 37°C), que depois de uma hora foram induzidos durante seis horas com 0,5 mM de IPTG (Sigma) para a expressão. As bactérias foram colhidas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS, lisados na "French Press" e o lisado foi separado dos

resíduos insolúveis por centrifugação. Para todas as proteínas FasL foram obtidos clones estáveis em células KEK293 por meio de seleção em 800 µg/ml de G418 (veja também no lugar indicado Schneider et al, J. Exp. Med. 1998).

5 Os ligantes triméricos e hexaméricos bem como super-FasL foram purificados a partir dos sobrenadantes de clones estáveis ou dos lisados bacterianos por meio de cromatografia de afinidade sobre agarose M2 (Sigma, Suíça), eluídos com 50 mM de citrato-NaOH (pH = 2,5) e logo a seguir, neutralizados com 0,2 volumes de tris-HCl (pH = 8). O tampão foi trocado
10 por PBS em concentradores (Centrikon-30, Amicon Corp., Easton, Texas, EUA).

Fusões de FasL com ACRP30 murino foram purificados da seguinte maneira. Os sobrenadantes foram adicionados com 50 mM de NaCl e 1 mM de CaCl₂ e o valor do pH foi ajustado por meio de ácido clorídrico/soda
15 cáustica para 7,0. Em seguida, a proteína recombinante foi ligada sobre agarose M1 (Sigma, Suíça) e eluída em TBS-EDTA (10 mM). O tampão foi trocado por PBS em concentradores. A concentração de proteínas purificadas foi determinada pelo processo de ácido bicinoconínico (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EUA) com a aplicação de albumina de soro bovino como
20 padrão e a pureza das amostras foi determinada por SDS-PAGE e tingimento Coomassie-Blue.

As proteínas de fusão de TRAIL, TNF α e CD40L com ACRP30 foram acrescentados nos respectivos ensaios na forma de sobrenadantes enriquecidos, que foram preparados da seguinte maneira: células 293T
25 foram transfectadas com os respectivos plasmídeos de expressão pelo método do fosfato de cálcio. Depois que as células estavam incubadas durante 16 horas com o precipitado, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 4 dias em meio sem soro (Optimem, Gibco BRL). Os sobrenadantes foram reduzidos em um vigésimo de seu volume inicial por concentradores e
30 a presença da proteína foi testada por "Western-Blotting". No caso de TRAIL-ACRP30 e TNF α -ACRP30 compararam-se titulações destas proteínas com titulações de TRAIL ou TNF α trimerizado purificado, para determinar a

respectiva concentração das proteínas recombinantes.

(c) Revisão do peso molecular do multímero por cromatografia de permeação de gel:

O tamanho das diversas proteínas de fusão foi determinado por filtração de gel sobre Superdex 200 HR10/30 (Pharmacia). Proteína recombinante foi carregada com o padrão interno katalase e ovalbumina no caso dos ligantes tri- e hexaméricos, com ferritina e ovalbumina para as proteínas de fusão ACRP30 sobre a coluna em um volume de 200 µl, depois foram eluídas com PBS (0,5 ml /min) e acumuladas nas frações de 0,25 ml. A presença das proteínas nas diversas frações após precipitação por ácido tricloroacético foi determinada pelo "Western-Blotting". O tamanho das proteínas foi determinado com auxílio de uma reta de regressão, constituída de tiroglobulina (660 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (262 kDa), aldolase (158 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), quimotripsinogênio A (25 kDa) e ribonuclease A (13,7 kDa).

(d) Células:

Células A20 de linfoma B murinas foram mantidas em DMEM, que continha 5 % de FCS inativado pelo calor. As células Jurkat de linfoblastoma T humano, células de linfoma de Burkitt BJAB foram cultivadas em RPMI de 10 % de FCS. As células renais embrionárias humanas 293 foram cultivadas em uma mistura de várias substâncias DMEM F12 (1:1), acompanhadas de 2 % de FCS. Todos os meios continham antibióticos (penicilina e estreptomicina em 5 µg/ml em cada caso e neomicina em 10 µg/ml). A linha de células T citotóxica murina dependente de IL-2 CT6, foi cultivada no RPMI, apoiada por 10 % de FCS, 1 mM de pivurato de sódio, 50 µM de 2 mercaptoetanol, 10 mM de hepes e 10 % de sobrenadante de célula EL-4 condicionado.

(e) Ensaio citotóxico:

O ensaio citotóxico foi efetuado essencialmente, tal como descrito por Schneider et al. (J.Biol. Chem. 272:18827-18833, 1997). Neste caso, 50.000 células foram incubadas pelo período de 16 horas em 100 µl de meio, sendo que o meio continha as concentrações dos ligantes indica-

dos na presença ou ausência de 1 µg/ml de anticorpos M2 (2 µg/ml para TRAIL). As quotas de sobrevivência das células foram determinadas com auxílio de PMS/MTS (metossulfato de fenancina 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio, sal) (Promega Corp., Madison, WI). O desenvolvimento da cor foi permitido durante o tempo necessário (tipicamente 1-3 horas). A capacidade de absorção foi medida em 490 nm.

(f) Ensaio de proliferação de células B

Células positivas CD19 foram selecionadas e purificadas por FACS-Sorting de PBL humano (linfócitos de sangue periférico) com "Beads" magnéticos, ao contrário, células negativas CD19 foram irradiadas com 3000 rad. 100000 células positivas CD19 purificadas foram incubadas com 100000 PBL irradiadas autológicas negativas CD19 em 120 µl de meio (RPMI 10 % FCS, antibióticos) com as proteínas de fusão CD40L solúveis tituladas, com ou sem anticorpo M2 (10 µg/ml) durante 72 horas em placas com 96 "cavidades". Em seguida, as células foram pulsionadas durante 6 horas com timidina-³[H] e a incorporação foi medida com a contagem por cintilação líquida ("Liquid Scintillation Counting").

Ademais, com relação à descrição dos métodos aplicados para a execução dos exemplos de execução faz-se referência expressamente a Schneider et al. (J. Exp. Med., Volume 187, número 8, 1998, 1205-1213) e a publicações ali citadas como referências.

1. Exemplo de execução.

Foi expressa uma proteína de fusão recombinante (2), que apresentou os aminoácidos 103 até 281 do hFasL (h: humano) como componente A e terminal N do aminoácido 103 do componente A como componente B uma sequência com comprimento de 18 aminoácidos (VDLEGSTSNRQCAGIRL, chamado ligante específico). Além disso, no terminal N da proteína de fusão (terminal N do componente B) foi acoplada uma sequência flag com os aminoácidos DYKDDDDK e uma sequência de ligante GPGQVQLQ seguinte (figura 1).

Para ensaios comparativos foi expressa uma proteína de fusão

(1), o terminal N apresentou igualmente a seqüência flag mencionada acima com o mesmo terminal C da seqüência de ligante seguinte e neste ligado no terminal C os aminoácidos 139 até 281 de hFasL. Proteína de fusão (1) difere-
 5 abrangeu o ligante específico e os aminoácidos 103 até 138 de hFasL (figura 1).

A construção do vetor das proteínas de fusão (1) e (2) foi efetuada pelo método de operação descrito de acordo com (a). A expressão e purificação das proteínas de fusão foi efetuada pelo processo representado
 10 em (b).

As proteínas de fusão (1) purificadas foram submetidas a condições redutoras ou não-redutoras e, em seguida, separadas eletroforeticamente por gel (figura 2), ligadas com uma determinação grossa do peso molecular das respectivas bandas.

15 Finalmente, células A20 e Jurkat cultivadas de acordo com (d) foram retiradas e submetidas a um ensaio citotóxico de acordo com (e). Para cada uma das duas linhas de células o ensaio foi efetuado em cada caso com crescentes concentrações de proteína de fusão (1) trimerizada ou de bimeros de trímeros (isto é, hexâmeros) da proteína de fusão (2) na presen-
 20 ça ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, Buchs, Suíça) (figura 3), determinando-se a capacidade de absorção em OD 490 nm.

2. Exemplo de execução.

Foi expressa uma proteína de fusão recombinante (3), que apresentou os aminoácidos 103 até 281 do hFasL como componente A e terminal N do aminoácido 103 do componente A, como componente B uma se-
 25 qüência com comprimento de 18 aminoácidos (VDLEGSTSNRQSAGIRL, ligante específico). Além disso, no terminal N da proteína de fusão (terminal N do componente B) foi acoplada uma seqüência flag com os aminoácidos DYKDDDDK e uma seqüência ligante seguinte GPQVQLQ (figura 4).

30 Para ensaios comparativos a proteína de fusão (1) foi expressa tal como no primeiro exemplo de execução (figura 4).

As construções dos vetores das proteínas de fusão (3) e (1) fo-

ram efetuadas pelos processos representados para o primeiro exemplo de execução. A expressão e purificação das proteínas de fusão foi efetuada pelo processo descrito em (b).

Finalmente, células A20 e Jurkat cultivadas de acordo com (d) foram retiradas e submetidas a um ensaio citotóxico de acordo com (e). Para cada uma das duas linhas de células o ensaio foi efetuado em cada caso com crescentes concentrações de trímeros da proteína de fusão (3) na presença ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, Buchs, Suíça) (figura 5), determinando-se a capacidade de absorção em OD 490 nm.

3. Exemplo de execução.

Foi expressa uma proteína de fusão recombinante (4), que apresentou os aminoácidos 139 até 281 do hFasL como componente A e terminal N do aminoácido 139 do componente A inicialmente o dímero do ligante com a seqüência LQ e depois ulteriormente terminal N como componente B uma seqüência com comprimento de 94 aminoácidos da proteína mACRP30 (AS 18 até 111), o domínio de oligomerização. Além disso, no terminal N da proteína de fusão (4) (terminal N do componente B) foi acoplada uma seqüência flag com os aminoácidos DYKDDDDK e uma seqüência ligante subsequente GPGQVQLH (figura 6A). Para ensaios comparativos foi aplicada a proteína de fusão (1).

A expressão e purificação das proteínas de fusão foi efetuada pelo processo representado em (b).

Finalmente, células de linfoma BJAL-Burkitt cultivadas de acordo com (d) foram retiradas e submetidas a um ensaio citotóxico de acordo com (4). O ensaio foi efetuado em cada caso com crescentes concentrações de trímeros da proteína de fusão (1) ou trímeros oligomerizados (dodecâmeros) da proteína de fusão (4), isto é, do FasL-ACRP30 recombinante (4x3), na presença ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, veja acima) (figura 7), determinando-se a capacidade de absorção em OD 490 nm.

4. Exemplo de execução.

Foi expressa uma proteína de fusão recombinante (5), que apresentou os aminoácidos 95 até 281 do hTRAIL (h: humano) como compo-

nente A e o terminal N do aminoácido 95 do componente A inicialmente do dímero ligante com a seqüência LQ e depois N-terminal ulterior como componente B uma seqüência longa com 94 AS da proteína mACRP30 (AS 18 até 111), os domínios da oligomerização). Além disso, no terminal N da proteína de fusão (terminal N do componente B) foi acoplada uma seqüência flag com os aminoácidos DYKDDDDK e uma seqüência ligante subsequente GPGQVQLH (figura 8).

Para ensaios comparativos foi expressa uma proteína de fusão (não representada na figura 8), que se apresenta em solução como trímero (trímero TRAIL). Esta proteína de ensaio comparativa apresenta (do terminal N para C a seqüência flag, o ligante com a seqüência GPGQVQLH e finalmente hTRAIL (AS 95 até 281). Com diferença para a proteína de fusão (5) falta, portanto, o componente B (mACRP30: AS 18 até 111) e o ligante com a seqüência LQ.

A expressão e purificação das proteína de fusão foram efetuadas pelos processos representados em (b).

Finalmente células Jukart de linfoblastoma T cultivadas de acordo com (d) foram retiradas e submetidas a um ensaio citotóxico de acordo com (4). O ensaio foi efetuado em cada caso com crescentes concentrações de trímeros da proteína de fusão sem a seqüência ACRP30 (para comparação) ou dos trímeros oligomerizados da proteína de fusão (5), isto é, de um dodecâmero do TRAIL-ACRP30 recombinante (4x3), na es ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, ver acima) (figura 9), determinando-se a capacidade de absorção em OD 490 nm.

5. Exemplo de execução

É expressa uma proteína de fusão recombinante (6), que apresentou os aminoácidos 77 até 235 do mTNF α (m: murina) como componente A e terminal N do aminoácido 85 do componente A, inicialmente o dímero ligante LQ e depois ulteriormente terminal N como componente B uma seqüência longa com 94 AS da proteína mACRP30 (AS 18 até 111), os domínios da oligomerização. Além disso, no terminal N da proteína de fusão (terminal N do componente B) foi acoplada uma seqüência flag com os aminoá-

cidos DYKDDDDK e uma seqüência ligante seguinte GPGQVQLH (figura 10).

Para ensaios comparativos foi expressa uma proteína de fusão (não representada na figura 10), que se apresenta em solução como trímero (trímero TNF α). Esta proteína do ensaio de comparação apresenta (do terminal N para o terminal C a seqüência flag, o ligante com a seqüência GPGQVQKF e finalmente mTNF α (AS 77 até 235). Diferentemente da proteína de fusão (6) falta portanto o componente B (mACRP30 : AS 18 até 111) e o ligante com a se LQ.

A expressão e purificação das proteínas de fusão foram efetuadas pelo processo representado em (b).

Com auxílio de um ensaio de proliferação celular de acordo com (f) mediram-se os efeitos, que pela adição de crescentes concentrações de trímeros TNF α ou oligômeros TNF α -ACRP30 (homodecâmeros de TNF α) na presença ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, ver acima) resultam em células CT6.

Para isso, as células CT6 foram colocadas pelo período de 4 dias na presença de concentrações reduzidas de sobrenadante EL-4 (2,5 %) antes do experimento de proliferação. As células foram incubadas em placas de titulação com 96 "cavidades" (40.000 células/"cavidade") pelo período de 16 horas com as concentrações indicadas de oligômeros TNF α -ACRP30 ou mTNF α na presença ou ausência de 2 μ g/ml M2-mAk e na ausência de sobrenadante EL-4. As células foram pulsionadas pelo período de 6 horas adicionais com timidina [3 H] (0,5 μ Ci/"cavidade"), expostas a três ciclos de congelamento e descongelamento e finalmente, colhidas. A incorporação da timidina [3 H] foi revista finalmente por uma medição de cintilação líquida (figura 11).

6. Exemplo de execução

Foi expressa uma proteína de fusão recombinante (7), que apresentou os aminoácidos 116 até 261 do hCD40L (h: humano) como componente A e terminal N do aminoácido 95 do componente A inicialmente o dímero do ligante LQ e depois ulteriormente terminal N como componente B,

uma seqüência longa com 94 AS da proteína mACRP30 (AS 18 até 111), os domínios de oligomerização). Além disso, no terminal N da proteína de fusão (terminal N do componente B) foi acoplada uma seqüência flag com os aminoácidos DYKDDDDK e uma seqüência ligante subsequente GPGQVQLH (figura 12).

Para ensaios comparativos foi expressa uma proteína de fusão (não representada na figura 12), que se apresenta em solução como trímero (trímero CD40L). Esta proteína do ensaio comparativo apresenta (do terminal N para o terminal C a seqüência flag, o ligante com a seqüência GPGQVQLH e finalmente hCD 40L (AS 116 até 261). Diferentemente da proteína de fusão (7) falta, portanto, o componente B (mACRP30: AS 18 até 111) e o ligante com a seqüência LQ.

A expressão e purificação das proteínas de fusão foram efetuadas pelos processos representados em (b).

Finalmente, o ensaio de proliferação celular descrito em (f) foi efetuado analogamente sobre PBL, sendo que o trímero CD40L ou oligômero CD40L-ACRP30 (homododecâmero) foram acrescentados na presença ou ausência de anticorpos M2 anti-flag (Sigma, ver acima) (figura 13).

7. Exemplo de execução

7.1 Execução experimental

O sétimo exemplo de execução ocupa-se com as proteínas de fusão, que se constituem de um componente A multi- ou oligomerizador e de um receptor como componente B.

(A) Construção do vetor

As proteínas de fusão foram construídas de um vetor PCR-3 modificado (de Invitrogen) como consequência de módulos permutáveis na seguinte ordem (5' depois de 3'):

(a) um módulo HindIII/Sall, que contém os domínios extracelulares de um receptor, onde precede uma seqüência Kozak GCCACC (no caso de hTNF-R1 (aminoácidos 1 - 211); h-TRAIL-R1 (aminoácidos 1 - 239), h-TRAIL-R2 (aminoácidos 1 - 212), h-TRAIL-R3 (aminoácidos 1 - 240) e hCD40 (aminoácidos 1 - 193) ou no caso de hFasR (aminoácidos 1 - 170) pela anteposição

de 24 nucleotídeos da região 5'- não transladada); (b) um ligante com comprimento de 14 aminoácidos (PQPQPKPQPKPEPE) em um cassete Sall/XhoI (tal como descrito por Terskikh et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1663); (c) um domínio de oligomerização em um módulo XhoI/NotI no caso de OPG (aminoácidos 187 - 401, aqui descritos como $\square$ N-OPG), CMP (aminoácidos 451 - 493), banco de genes 115555); COMP (aminoácidos 32 - 75, bando de genes 1705995); (d) um cassete NotI/XbaI, que contém uma marcação His₆-myc combinada e um códon Stop. O domínio de oligomerização foi enquadrado pelas seqüências de aminoácidos GGCC e ARTPGGGS nos terminais N ou C. Os ligantes foram aplicados para todas as construções. No caso das construções Fc clonaram-se a região "Hinge", os domínios CH2 e CH3 e o códon Stop como cassete hlgG1 com Sall/NotI, talco descrito anteriormente (Schneider et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 18827; Schneider et al. (1998) J. Exp. Med. 187, 1205). Linhas de células derivadas de HEK-293 estáveis foram estabilizadas para a preparação de proteínas recombinantes pela seleção em 800 µg/ml de G418 com auxílio dos processos descritos acima (Schneider et al. (1997) veja acima).

(B) Transfecção transiente

As células 293T foram transfectadas com o método CaCl₂ tal como descrito acima (Schneider et al. 1997, veja acima) e lavadas com PBS, antes de serem incubadas durante 3 dias no meio Optimem sem soro. Os sobrenadantes foram concentrados 30 vezes e mantidos congelados até o uso. A concentração das proteínas de fusão Faz/ $\square$ N-OPG e Faz/CMP em meio Optimem foram determinadas com auxílio de uma titulação em "Western Blots" com auxílio de Faz/COMP purificado como padrão.

(C) Purificação das proteínas recombinantes

Os sobrenadantes de células 293 transfectadas estáveis foram armazenadas sobre agarose M2 (como ligantes) ou sefarose de proteína A (proteínas de fusão Fc), lavadas com PBS e eluídas com 50 mM de citrato-NaOH (pH 2,5). O eluato foi neutralizado com tris-HCl (pH 8) e o tampão trocado por PBS em concentradores Centrikon-30 (da Amicon, Easton, Texas). As proteínas de fusão COMP e CMP foram purificadas em colunas de que-

lato de HiTrap. Para este fim, os sobrenadantes foram complementados por células 293 transfectadas estáveis com 500 mM de NaCl e 10 mM de imidazol e conduzidas sobre colunas pré-alimentadas com 0,5 M de ZnSO₄ (pH 2,5) e equilibrados em PBS. A coluna foi lavada com PBS e as proteínas foram eluídas com PBS, que continha 50 mM de EDTA. O tampão foi trocado por PBS, tal como descrito acima.

Flag-FasL e flag-TRAIL foram preparados da mesma maneira, tal como descrito acima (Schneider et al, 1997, J. Biol. Chem. 272, 18827 e Thome et al, 1997, Nature 386, 517). As duas publicações são componente totalmente extensíveis da publicação do presente objeto da invenção. Flag-CD40L (AS 116 até 261) foi expresso em bactérias e purificado em agarose M2, tal como foi descrito para flag-TRAIL. As concentrações de proteína foram determinadas com o método do ácido bicinoconínico. O grau de pureza foi examinado com SDS-PAGE e marcação Coomassie-Blue.

15 (D) Cromatografia de permeação de gel

No âmbito da cromatografia de permeação de gel a respectiva quantidade de proteína de fusão foi carregada em um volume de 200 µl sobre uma coluna Superdex 200 HR 10/30 (da Pharmacia) e eluída com 0,5 ml/min em PBS, sendo que simultaneamente foi desenhada a capacidade de absorção em 280 nm. As frações individuais (0,25 ml) foram - tal como escrito abaixo - analisadas em teste de citotoxicidade. Para a determinação do peso molecular a coluna foi calibrada com proteínas padrão tiroglobulina (669 kD), ferritina (440 kD), catalase (262 kD), aldolase (158 kD), albumina de soro bovino (67 kD), ovalbumina de pintos (43 kD), quimotripsinogênio A 25 (25 kD) e ribonuclease A (13,7 kD).

(E) ELISA competitivo

A ELISA competitiva foi efetuada, tal como descrito abaixo. Placas ELISA com 96 "cavidades" foram alimentadas com proteína de fusão receptor/Fc (0,2 µg/ml em PBS, 100µl, 16 horas, 25°C). As "cavidades" foram saturadas durante uma hora a 37°C em PBS, sendo que o PBS continha 5 % de soro bovino fetal (como tampão bloqueador). Ao aplicar sCD40L havia o tampão bloqueador PBS, contendo 4 % de leite desengordurado e 0,05

% de Tween-20. Proteínas de fusão FC ou COMP competidoras foram dissolvidas em série em 100 µl de tampão bloqueador na presença ou ausência de 1 µg/ml de proteína A. Os ligantes foram acrescentados em concentração constante (sFasL: 2 µg/ml, 36 nM, sTNFα: 0,02 µg/ml, 0,36 mM; sTRAIL: 0,1
 5 µg/ml, 1,4 nM; sCD40L: 0,5 µg/ml, 9,2 nM, tudo em tampão bloqueador) e puderam ligar durante um período de 1 hora a 37°C. Ligantes ligados foram identificados com anticorpo M2-anti-flag (1 µg/ml em tampão bloqueador, 100 µl, 45 minutos, 37°C). Anticorpos cabras-anticamundongo, acoplados em peroxidase, 1:2000 em tampão bloqueador, 100 µl, 30 minutos, 37°C) e
 10 cloridrato de o-fenilenodiamina (0,3 mg/ml em 50 mM de ácido cítrico, 100 mM de Na₂HPO₄, 0,01 % de H₂O₂). A capacidade de absorção foi medida em 490 nm.

(F) Teste de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram efetuados em placas com 96
 15 "cavidades" em um volume de 100 µl essencialmente tal como descrito por Schneider et al. (1997), veja acima. Os receptores quiméricos foram diluídos em série em um meio, que continua aquelas quantidades de ligantes citotóxicos, que puderam induzir mais de 95 % de morte celular. Onde está indicado, foi utilizada proteína A com uma concentração de 1 µg/ml. sFasL foi
 20 aplicado na presença de 1 µg/ml de M2 e sTRAIL na presença de 2 µg/ml de M2. Nenhum anticorpo M2 foi empregado nas séries de testes com sTNFα. As células foram expostas a uma incubação de 16 horas e suas cotas de sobrevivência com uso do sistema de teste PMS/MTS (fenazinmetossulfato/3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio, na
 25 forma de sal) (Promega, Madison, Wisconsin). A capacidade de absorção foi medida em 490 nm. Para poder indicar as concentrações molares das diferentes proteínas de fusão, avaliou-se o peso molecular, tal como segue: [(M_r+3 kDa teórico por glian acoplado a N previsto) x multiplicidade]. Faz;Fc, :COMP, "CMP, :□N-OPG: 98, 172, 100 ou 105 kDa. TRAILR2:Fc, :COMP, :CMP, :□N-OPG: 86, 142, 82 e 93 kDa. TNFR1;Fc, :COMP: 104 e 187 kDa.
 30 CD40:Fc, :COMP: 101 e 180 kDa. TRAILR2:Fc: 86kDa, TRAILR3:Fc: 127 kDa. Flag-TRAIL, flag-FasL, flag-TNFα flag-CD40L: 71, 55, 56 ou 54 kDa.

(G) Medições BIAcore

As medições BIAcore foram efetuadas em chips sensores modificados sobre carboximetildextrano CM5 (de BIAcore AB, Uppsala, Suécia) em uma velocidade de passagem de 5 μ l/minutos. Os chips CM5 foram ativados com uma administração de 50 μ l de uma mistura 1:1 de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida:N-hidroxisuccinimida. Seis μ l de uma solução de 100 μ g/ml de anticorpo monoclonal M2-anti-flag em 10 mM de NaHCO₃ (pH 5,5) foram conduzidos então, sobre a superfície ativada. Uma administração de 50 μ l de etanolamina-HCl 1M desativou os ésteres N-hidroxisuccinimídicos remanescentes. A quantidade de anticorpo M2 imobilizado, que foram utilizados para este método de operação, encontrou-se em aproximadamente 4600 unidades. Para a análise das interações da FasL-Faz: proteína de fusão e TRAIL-TRAIL-R2: proteína de fusão uma quantidade constante de ligante marcado foi imobilizada sobre uma superfície modificada M2. Para obter isto, uma dose de 7 μ l de 2,5 μ g/ml de flag-FasL ou flag-TRAIL foi aplicada sobre a superfície. Isto conduziu à ligação de aproximadamente 100 até 150 unidades. Estas condições permitiram ademais uma dissociação mínima dos ligantes da superfície M2, enquanto que elas permitiram simultaneamente uma ligação do receptor seguinte suficiente para a análise. A ligação do receptor:proteína de fusão foi analisada depois por 15 μ l de injeção de receptor:proteína de fusão purificada em concentrações entre 1 e 100 μ g/ml, correspondendo a 100 até 150 unidades. A cinética de associação foi medida para a duração de 3 minutos e a genética de dissociação durante o período de 3 até 5 minutos. A superfície foi então regenerada (em uma superfície M2 simples) por uma dose de 5 μ l de 50 mM de citrato-HCl (pH 2,5). Até 30 decursos subseqüentes de ligação e regeneração pôde ser efetuado sem alteração significativa das propriedades de ligação de anticorpos M2 imobilizados. As cinéticas de dissociação e associação foram analisadas com auxílio do programa de análise de cinética do produtor com o emprego dos modelos $AB=A+B$ e $A+B=AB$.

(H) Cultivo de hepatócitos de camundongos primários

Para o cultivo de hepatócitos de camundongo primários sacrifi-

caram-se camundongos C57BL/6 e a região do fígado acima do recipiente biliar imediatamente removido, para mantê-lo depois em um meio "Hepato-cyten-Attachment Medium" (HAM). A região do fígado foi perfundida inicialmente com 16 ml de 10 mM Hepes (pH 7,6), para afastar os eritrócitos, depois tratado com 12 ml de 0,5 mg/ml de colagenase H (da Boehringer Mannheim) em Hepes (4 mM de CaCl_2) e depois homogeneizado em uma placa de Petri em Hepes. As células foram lavadas em Hepes, depois centrifugadas (100xg, 30 segundos) e resuspensas em solução de Percoll isotônica a 60 % (da Pharmacia) em HAM e novamente centrifugadas (700xg, 2 minutos). Todos os tampões e o meio foram aplicados a 37°C. As células sedimentadas foram resuspensas em HAM, contadas, expostas sobre placas de microtitulação de xícara plana (10 000 por cavidade, 200 μl) e puderam aderir correspondentemente. A mistura experimental (inibidores diluídos em série, sFasL (concentração final: 400 ng/ml, 7 nM) e anticorpos M2 (concentração final: 1 $\mu\text{g/ml}$)) foram acrescentadas e as células incubadas durante outras 16 horas. O sobrenadante foi removido, foi acrescentado HAM fresco (100 μl) e o teste de sobrevivência PMS/MTS efetuado, tal como descrito acima.

(I) Morte celular induzida por ativação

Placas de microtitulação com xícara plana foram revestidas com CD3 anti-humano Tr66 (10 $\mu\text{g/ml}$) em PBS durante o período de 3 horas a 37°C. As placas foram lavadas duas vezes em PBS e uma vez com meio RPMI 1640. Células Jurkat (5×10^5 células por ml, 100 μl) foram misturadas com os inibidores e distribuídas em cada "cavidade", depois centrifugadas (200xg, 3 minutos) e incubadas pela duração de 24 horas a 37°C. A capacidade de sobrevivência das células (em OD 490 nm) foi medida, tal como descrito acima. A proteção celular específica (em %) foi calculada como segue: $[(\text{anti-CD3} + \text{inibidor}) - \text{anti-CD3}] / [(\text{controle}) - (\text{anti-CD3})] \times 100$.

Para a preparação de uma cultura de leucócitos misturada células do baço de células de baço de camundongos com deficiência de perforina ou gld C57BL/6 (H-2^b) foram cultivadas com células de baço de camundongos Balb/c (H-2^d) irradiadas com gamma (36 Gy) durante um período de

5 dias. Antes de sua aplicação células não em condições de viver foram removidas das amostras por uma centrifugação de gradiente de Ficoll-Paque (da Pharmacia Biotech). A marcação foi efetuada pelos métodos descritos acima (Kataoka et al). Abreviando, as células visadas (células A20) foram

5 marcadas com cromato de sódio [^{51}Cr] (da Dupont, Boston, MA) durante o período de 1 hora, depois lavadas três vezes com RPMI 1640. Células MLC foram misturadas com as células visadas (10^4 células por "cavidade") em placas de microtitulação em forma de U na presença ou ausência de Faz:Fc e Faz:COMP em 40 $\mu\text{g/ml}$ em um volume final de 200 μl e as placas foram

10 centrifugadas (200xg, 3 minutos). Depois da incubação durante 4 horas os sobrenadantes foram removidos e sua radioatividade medida. A liberação específica [^{51}Cr] (em %) foi determinada com auxílio da seguinte fórmula: $[(\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})] \times 100$.

15 (K) Marcação FACS

Para a marcação FACS o clone CD40L⁺-Jurkat D.1 (5×10^5 células) foi incubado com 2 μg de Cd40:COMP em tampão FACS (PBS, 10 % de soro bovino fetal e 0,02 % de NaN_3). Fas:COMP foram aplicados como controle negativo. Receptor:COMP foi detectado com 1 μg de 9E10 anticorpo

20 anti-myc e subsequente tratamento com anticorpo cabra-anti-camundongo marcado com FITC (1:100). Incubações foram efetuadas durante o período de 20 minutos a 4°C em 50 μl de tampão FACS.

(L) Tese de proliferação de célula B

Para o ensaio de proliferação da célula B células CD19⁺ de linfócitos de sangue periférico humano (PBL) foram purificadas com "Beads" magnéticos (esférulas) e as células CD19⁻ restantes foram irradiadas (3000 rad). 10^5 células CD19⁺ purificadas foram misturadas com 10^5 CD19⁻ PBL autólogo irradiado em 120 μl de um meio, que continua sCD40L em uma

25 concentração de 100 ng/ml (1,8 nM) de anticorpos M2 em 10 $\mu\text{g/ml}$ mais ou menos proteína A com uma concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ e as concentrações

30 indicadas de CD40:Fc ou CD40:COMP. As células foram cultivadas depois durante 72 horas em placas com 96 cavidades, pulsionadas durante 6 horas

com timidina [^3H] (1 μCi /cavidade) e colhidas. A incorporação da timidina [^3H] foi testada pela contagem de cintilação líquida.

7.2 Resultados do sétimo exemplo de execução.

Proteínas de fusão, que se constituem dos domínios extracelulares de um receptor, que é fusionado na parte Fc de IgG (receptor;Fc), são conhecidas dos agentes inibidores para o desenvolvimento de ações recíproca de ligantes de receptores do estado da técnica. No sétimo exemplo de execução o tamanho da proteína de fusão Fas;Fc purificada foi examinado por cromatografia de exclusão e verificou-se, que um único pico foi eluído com o tempo de retenção esperado. Frações contendo Fas;Fc estavam e condição, de proteger células A20, que estavam expostas a uma dose letal de FasL solúvel (sFasL), da morte celular, embora a medida de proteção (até 50 %) era extraordinariamente baixo, quando se considera, que a razão avaliada de Fas:Fc para FasL no ensaio importou em aproximadamente 1000.

Uma fraca atividade protetora foi observada em algumas das frações anteriores do eluato, que continham provavelmente para quantidades insignificantes não detectáveis de complexos de alto peso molecular de Fas.Fc. De acordo com a invenção, foi reconhecido, que tais agregados superiores da proteína de fusão podem atuar como potentes inibidores da morte celular iniciada por FasL. Por isso, inicialmente esta fração de alto peso molecular de Fas:Fc agregada foi aumentada, acrescentando-se o agente imunoglobulina de reticulação cruzada proteína A. Tão logo a análise foi efetuada sob condições, nas quase somente cerca de 10 % do Fas:Fc injetado foi mudado para as frações a serem recentemente eluídas, foi evidente, que complexos Fas:Fc de alto peso molecular é um antagonista eficiente da citotoxicidade induzida pelo FasL. Em comparação com isso resultou, que as frações Fas:Fc restantes eluíram sempre ainda como dímeros e só oferecem proteção parcial para as células apesar da concentração 10 vezes maior. De acordo com a invenção, estes resultados do sétimo exemplo de execução mostram, que a formação de agregados Fas:Fc superiores aumenta essencialmente a atividade protetora específica.

Com base nestes conhecimentos foi construído, por conseguinte

complexos de proteínas de fusão de acordo com a invenção, que em virtude de um aumento do grau de oligomerização de Fas mostram uma melhor afinidade em comparação com FasL e que aperfeiçoam as propriedades inibitórias. Proteínas de fusão de acordo com a invenção são por exemplo,

5 aquelas, nas quais os domínios extracelulares de receptores da família TNF, por exemplo, FAS, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TNF-R1 ou CD40, são fusionadas através de um ligante com 14 aminoácidos de comprimento nos domínios oligomerizadores ou da chamada Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP); proteína de fusão denominada como: receptor:COMP) ou da

10 chamada Cartilage Matrix Protein (CMP); proteína de fusão: receptor:COMP). Estas proteínas de matriz ou seus domínios possuem a propriedade nativa, de formar pentâmeros ou estruturas trímeras coiled-coil. As proteínas de fusão mencionadas acima (bem como também receptor:Fc-proteínas de fusão como controles) foram expressas em células de mamíferos e purificadas por

15 cromatografia de afinidade em colunas de quelato de metal ou sobre proteína A. Os receptores Fas e TRAIL-R2 foram ligados no sétimo exemplo de execução também aos domínios de dimerização terminais C da proteína osteoprotegerina da família TNF (receptor:OPG).

Os receptores, que estavam fusionados na COMP ou CMP, oligomerizaram, o que pôde ser mostrado pela vagarosa migração no gel de poliacrilamida sob condições não-redutoras. Fas:COMP e TRAIL-R2: CMP eluíram como "picos" bem definidos com pesos moleculares aparentes de aproximadamente 400 ou 170 kDa na aplicação do método da cromatografia de permeação de gel. Os pesos moleculares concordam com as estruturas

25 pentâmeras ou trímeras das proteínas de fusão. Dos experimentos do sétimo exemplo de execução pode ser concluído, portanto, que as propriedades de agregação de domínios de oligomerização coiled-coil das proteínas de matriz mencionadas acima não são prejudicadas pela fusão com proteínas (ou domínios de proteínas) da família do receptor TNF.

30 A proteína de fusão Fas:COMP mostrou um K_D mais baixo do que Fas:Fc, se foi permitido às proteínas de fusão, iniciar a competição pela ligação sFasL em comparação com Fas:Fc aplicada. Em concordância com

este resultado, foi medida uma constante de dissociação de 0,77 nM para a ação recíproca FasL-Fas:COMP, que é aproximadamente 8 até 9 vezes mais baixa do que os valores comparativos para Fas:Fc. Na grande maioria das linhas de células testadas demonstrou-se, que a atividade inibidora de Fas:COMP é aproximadamente 10 até 20 vezes maior do que aquela para a proteína de fusão dímera Fas:Fc, enquanto que os resultados para agregados Fas:Fc, provocados pela proteína A reticulada cruzada (Fas:Fc/PA), mostraram valores entre aqueles para Fas:COMP e Fas:Fc. A atividade protetora da proteína de fusão Fas: δ N-OPG dímera era comparável com a do complexo Fas:Fc dímero. Fas:COMP trímero inibiu a lise realizada com sFasL aproximadamente tão eficazmente como a Fas:Fc/PA - no resultado portanto 5 x menos eficaz do que Fas:COMP. A atividade inibidora de Fas:COMP era boa ou melhor do que a dos anticorpos monoclonais NOK-1, 4H9 e 4A5 bloqueados por FasL. A atividade inibidora superior de Fas:COMP, comparada com o complexo Fas:Fc, também era evidente de ensaios com hepatócitos de camundongos primários ou do sistema de modelo para a morte celular induzida pela ativação com células Jurkat ativadas com anti-CD3. Em todos estes experimentos resultou para Fas:Fc/PA um valor de proteção médio. Além disso, foi examinado, se Fas:COMP pode inibir o efeito de FasL, expresso sobre CTLs. A morte das células A20 em um sistema de teste de 4 horas depende unicamente de perforina e dos processos de transdução de sinal dependentes de FasL, porque CT1s, que são deficientes tanto para perforina como também para FasL não têm nenhum efeito sobre estas células. Em um ensaio correspondente as células A20 foram mortas de acordo com a espera tanto por CTLs deficiente em perforina como também por CTLs deficientes em FasL. Fas:Fc e Fas:COMP provocaram especificamente uma determinada medida de proteção para as células, que foram expostas ao CTLs deficiente em perforina.

Em uma comparação das afinidades de sCD40L com CD40:Fc, CD40:FC/PA ou CD40:COMP de acordo com a invenção por ELISA de competição, foi observado um aumento prejudicial da afinidade (30 vezes) para o receptor pentamerizado, enquanto que novamente se ajustou um efeito mé-

dio para CD40:Fc/PA (8 vezes). Com relação à pergunta, se CD40:COMP também pode reconhecer CD40L ligado à membrana, a linha de células D1.1 derivatizada da Jurkat, que exprime constitutivamente a proteína superficial CD40L, foi efetuada para a execução de uma análise de marcação FACS com auxílio das proteínas de fusão CD40 como amostras. Uma marcação significativa foi observada para a CD40:COMP de acordo com a invenção, pelo que é indicado, que CD40-COMP está em condição na ação para a ligação no CD40L não processado nativo. Para examinar a atividade específica de proteína de fusão CD40 em um sistema biológico, tentou-se inibir a proliferação dependente do CD40L de células B humanas, que foram co-estimuladas com receptor de célula anti-B. Nem CD40;Fc nem CD40:Fc/PA puderam prejudicar a proliferação significativamente, mesmo no caso, que ser administrada em grandes doses. Ao contrário disso, a CD40:COMP de acordo com a invenção estava em condição, de bloquear a proliferação já em doses relativamente baixas.

Resumindo, pode verificar-se das experiências do presente exemplo de execução, que a inibição da apoptose induzida pelo FasL aumentou pelos inibidores competitivos independente do grau de oligomerização e as atividades relativas dos diferentes inibidores (expressas como razão de seus respectivos valores IC50) permaneceram relativamente constantes para as diferentes linhas de células. A eficácia inibidora aumentada de Fas:COMP de acordo com a invenção em comparação com Fas.Fc é provavelmente o resultado de sua maior atividade. Resultados semelhantes também puderam ser determinados para a atividade da proteína de fusão CD40. CD40:COMP de acordo com a invenção é nitidamente superior a CD40:Fc na inibição da proliferação induzida por CD40L de células D primárias in vitro. Com isso, os resultados do exemplo de execução 7 mostram, que as constantes de dissociação na faixa nanomolar baixa podem ser obtidas para aqueles receptores, tais como por exemplo, Fas e CD40, que se destacam nativos por atividade média para seus ligantes, quando eles - tal como previsto de acordo com a invenção, são componente de proteínas de fusão, que se destacam por um maior grau de oligomerização.

São anexadas as listagens de seqüências referentes às seqüências SEQ ID NOs. 1 a 8.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão consistindo em um componente A e um componente B, caracterizada pelo fato de que o componente A é um fragmento extracelular de uma citocina TNF e o componente B contém um fragmento multimerizante ou oligomerizante de uma proteína ACRP30, que multimeriza e oligomeriza a proteína de fusão sem a ação de moléculas externas.

2. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o fragmento do componente B corresponde à sequência de aminoácidos do fragmento de mACRP30 presente nas posições 17 a 108 da SEQ ID NO:4 ou à sequência de aminoácidos do fragmento hACRP30 presente nas posições 17 a 107 de SDEQ ID NO:8.

3. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o componente A é um fragmento extracelular de uma citocina TNF, selecionada a partir do grupo consistindo na sequência de aminoácidos do fragmento de hFasL presente nas posições 111 a 252 de SEQ ID NO. 4, na sequência de aminoácidos do fragmento de hTRAIL presente nas posições 111 a 296 de SEQ IN NO:5, na sequência de aminoácidos do fragmento de hCD40L presente nas posições 111 a 255 de SEQ ID NO. 7 e na sequência de aminoácidos do fragmento de mTNF ou hTNF presente nas posições 111 a 268 de SEQ ID NO:6.

4. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que as proteínas recombinantes compreendem um ligante entre o componente A e o componente B, em que o ligante é a sequência de aminoácidos LQ presente nas posições 109-110 de SEQ ID NO: 4 ou a sequência de aminoácidos MHVD presente nas posições 108 a 111 de SEQ ID NO: 8.

5. Oligômeros, caracterizados pelo fato de que são de proteínas de fusão recombinantes, como definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Sequência de DNA recombinante, caracterizada pelo fato de que codifica uma proteína de fusão, como definida em qualquer uma das

reivindicações 1 a 5.

7. Uso de oligômeros, como definidos na reivindicação 5, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de distúrbios hiperinflamatórios, doenças autoimunes, doenças originadas de distúrbios hiper- ou hipoapoptóticos, doenças infecciosas, especialmente infecções virais, doenças de tumores, especialmente tumores do sistema linfático e/ou distúrbios endocrinológicos.
- 5

8. Uso de oligômeros, como definidos na reivindicação 6, caracterizado pelo fato de ser para diagnóstico *in vitro*.

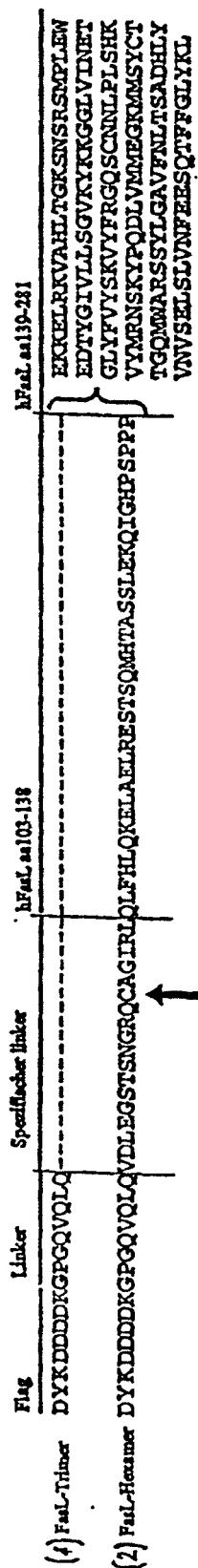


Fig.1

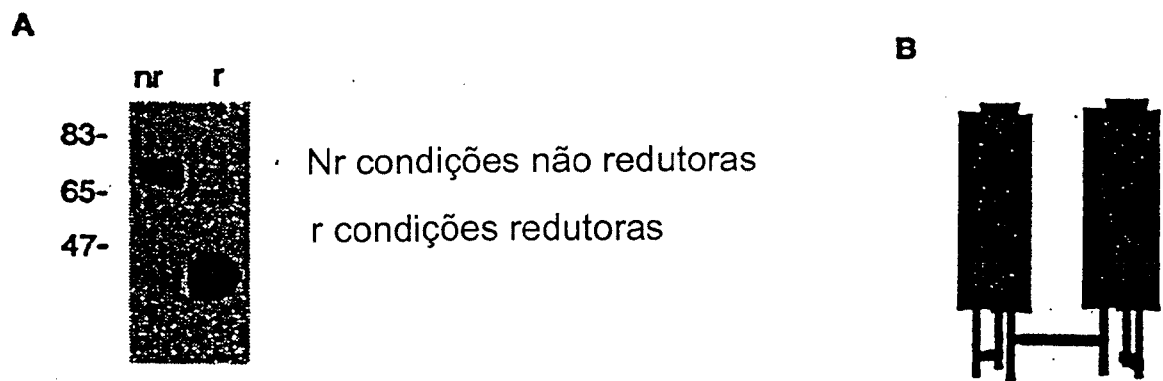
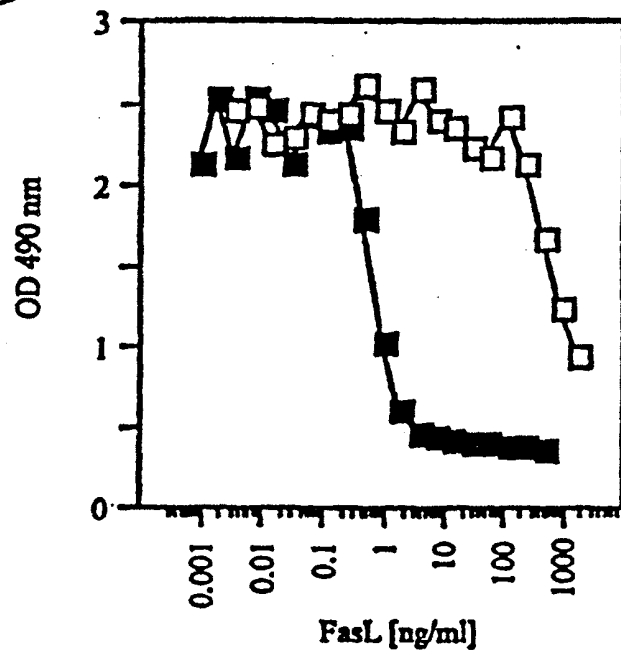


FIG. 2

Fig. 3A

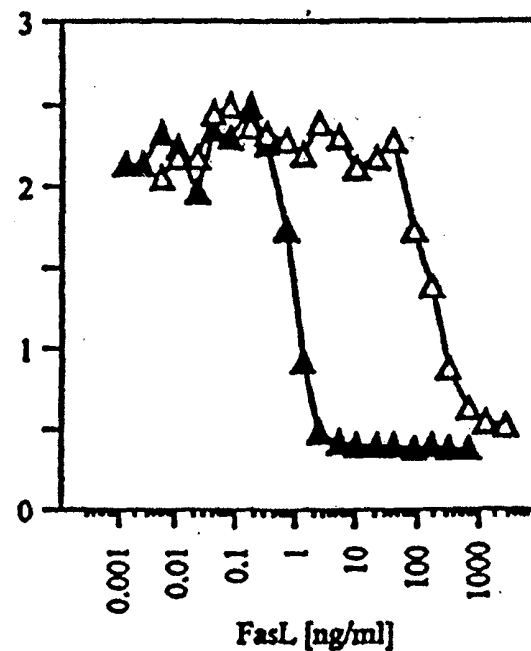
④

FasL-Trimer $\pm$ M2 Sobre A20



③

FasL-Hexamer $\pm$ M2 Sobre A20

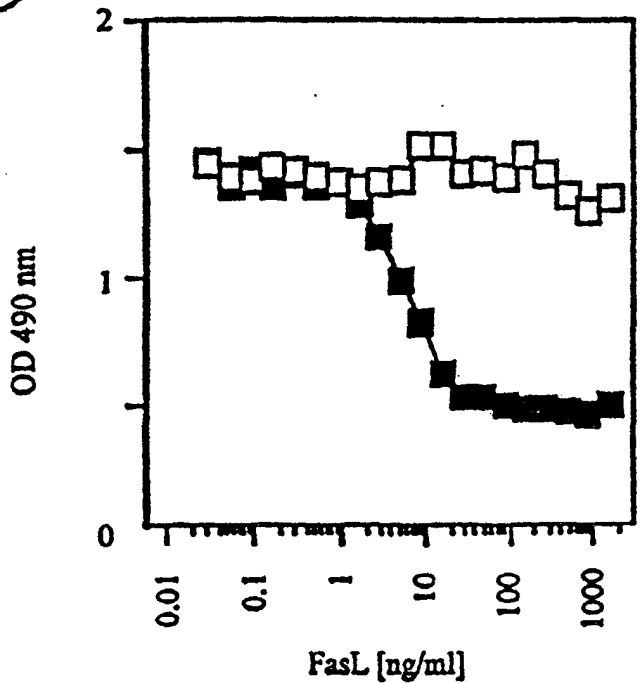


- +Anticorpo anti-flag M2
- ▲
- -Anticorpo anti-flag M2
- △ -Anticorpo anti-flag M2

FIG 3B

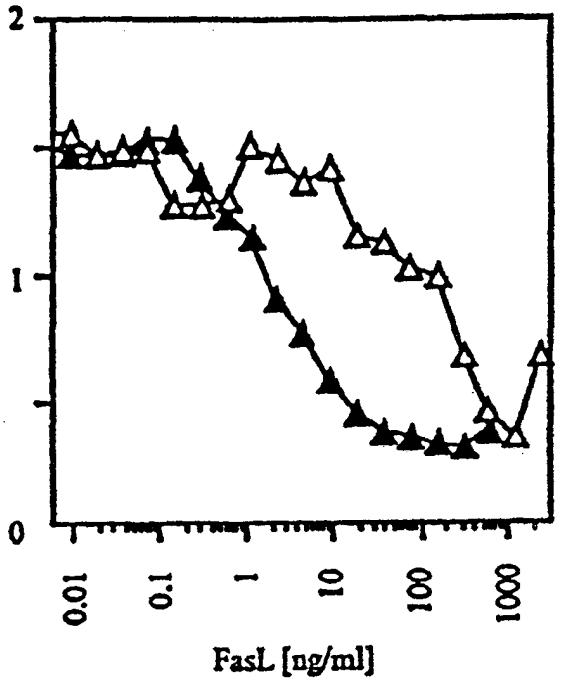
C

Trímero fasl $\pm$ m2 sobre jurkat hexamer = hexâmero



D

Trímero fasl $\pm$ m2 sobre jurkat hexamer = hexâmero



- +Anticorpo anti-flag M2
- ▲
- -Anticorpo anti-flag M2
- △

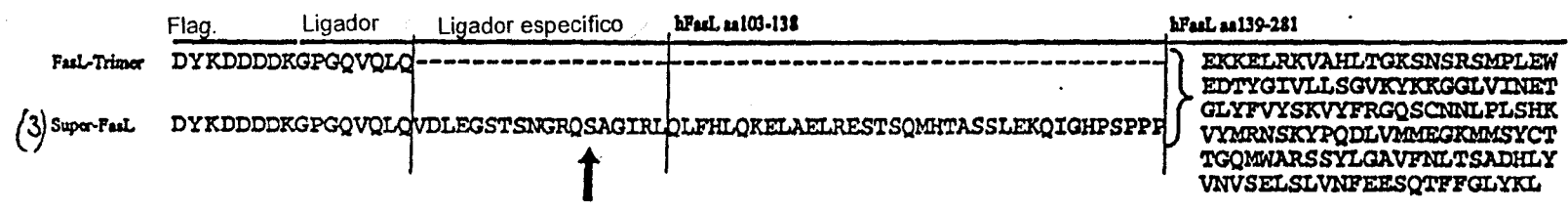
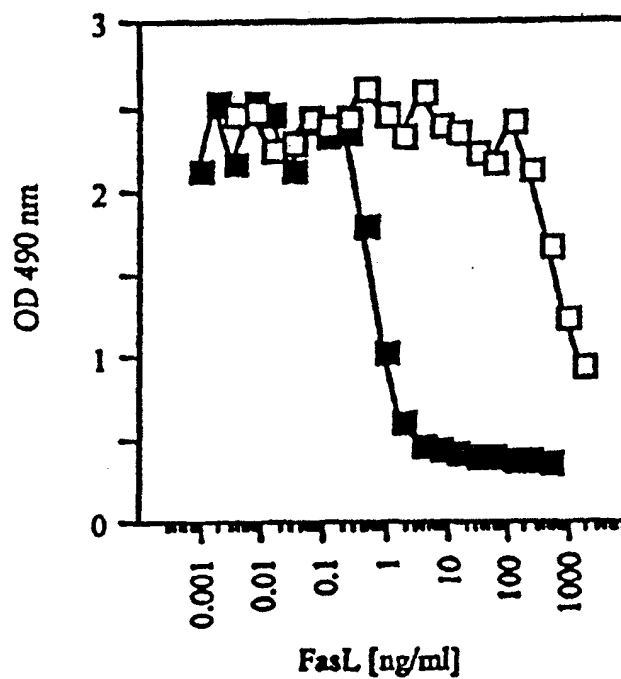


Fig.4

Fig. 5A

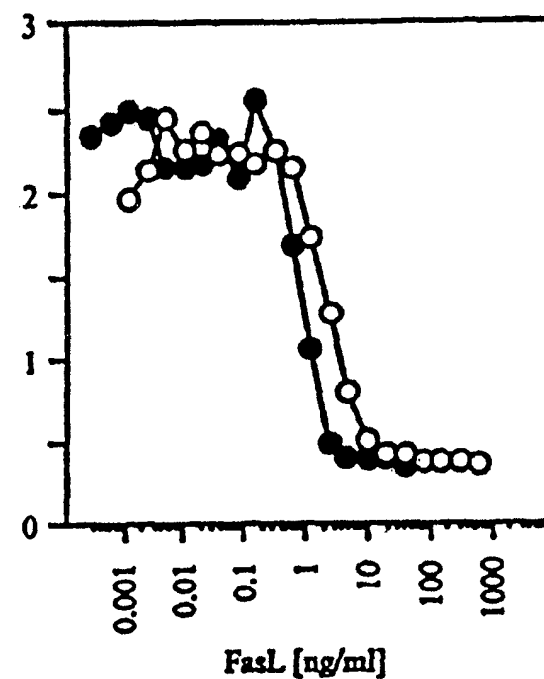
(A)

FasL-Trimer $\pm$ M2 Sobre A20



(B)

Super-FasL $\pm$ M2 Sobre A20



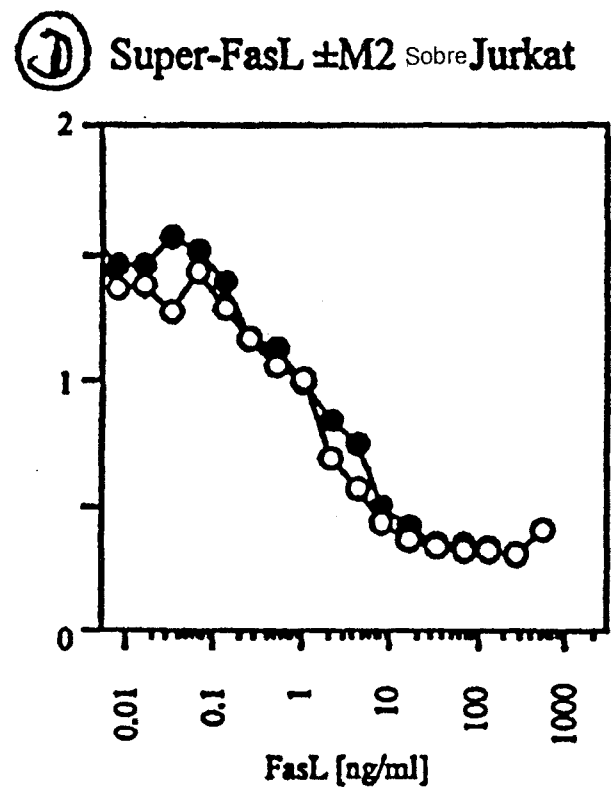
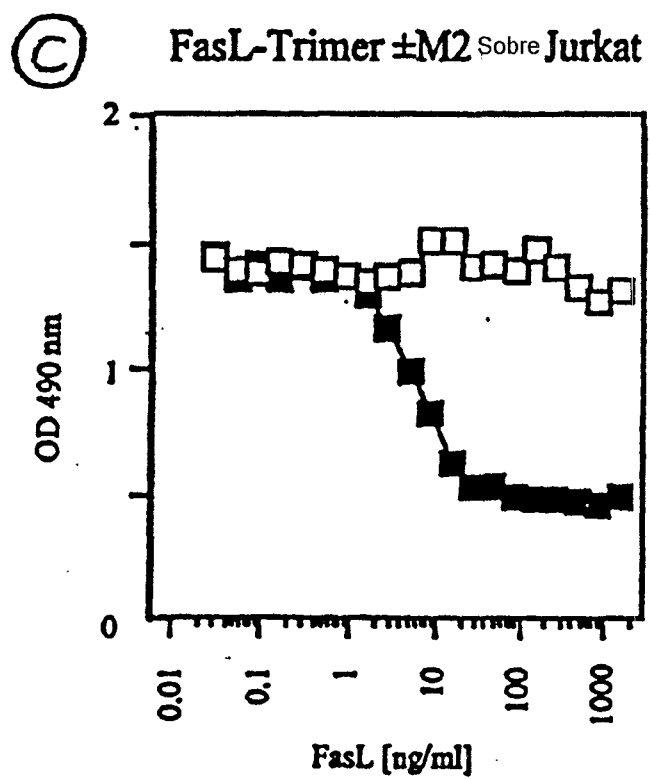
■ +Anticorpo anti-flag M2

●

□

○ -Anticorpo anti-flag M2

Fig. 5B

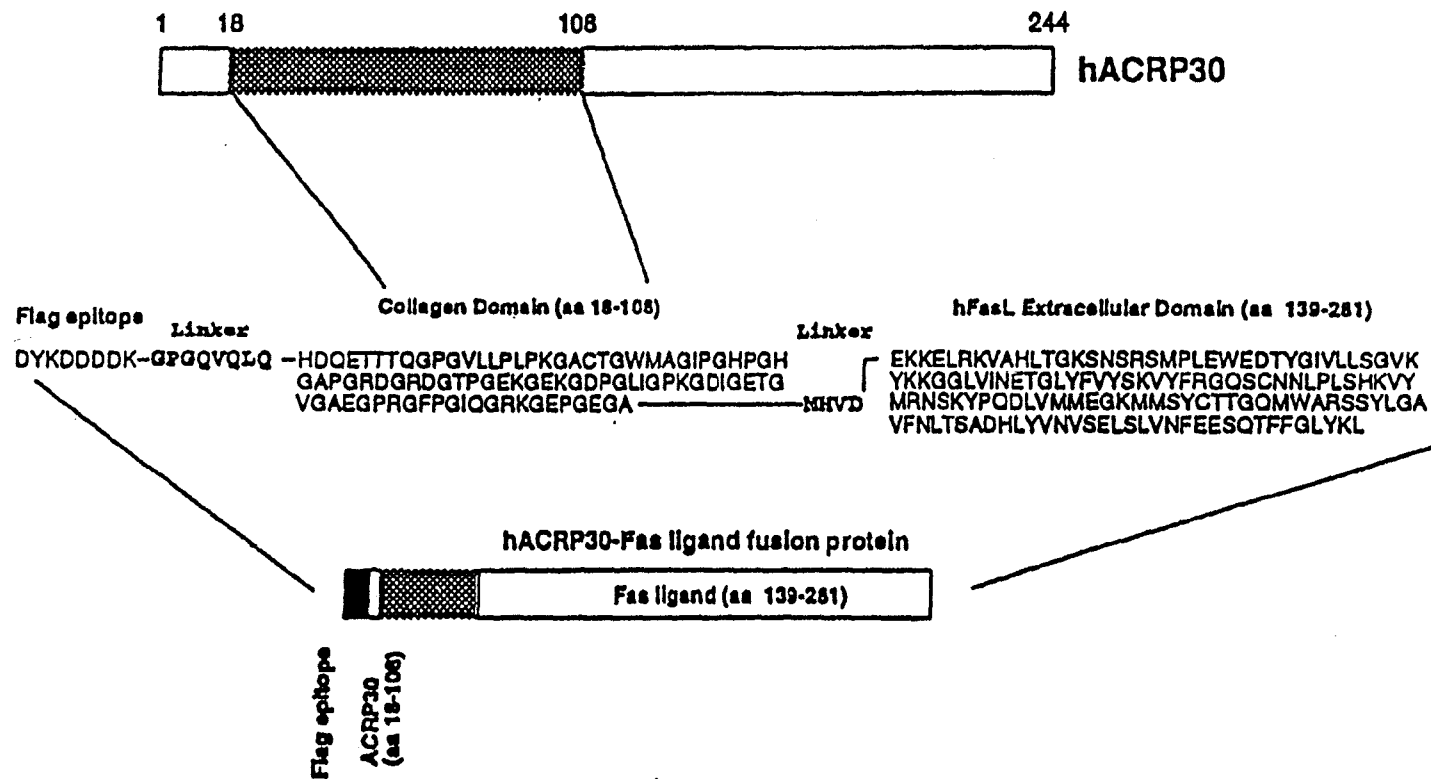


 +Anticorpo anti-flag M2
 -Anticorpo anti-flag M2
 +Anticorpo anti-flag M2
 -Anticorpo anti-flag M2

	Flag.	Ligador	Ligador específico	
(4) FasL-ACRP30	DYKDDDDKGPQVQLH	EDDVTTTEELAFALVFPFKGTCAGWMAGIPGHFGHNGTFGRDGRDG	TPGEKGEKGDAGLLGPKGETGCVGMTCAEGPRGFFGTPGRKGEPEL	hFasL aa139-281
				LQKKELRKVAHLTGKSNRSRSMLEWEDTYGI LLSGVKYRKGGLVINETGLYFVYSKYFR GQSCNNLPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEG KMMSYCTTGQMWARS SYLGAVFNLTSAH LYVNVSELSLVNFEEESQTFGLYKL

Fig.6 A

FIG. 6B



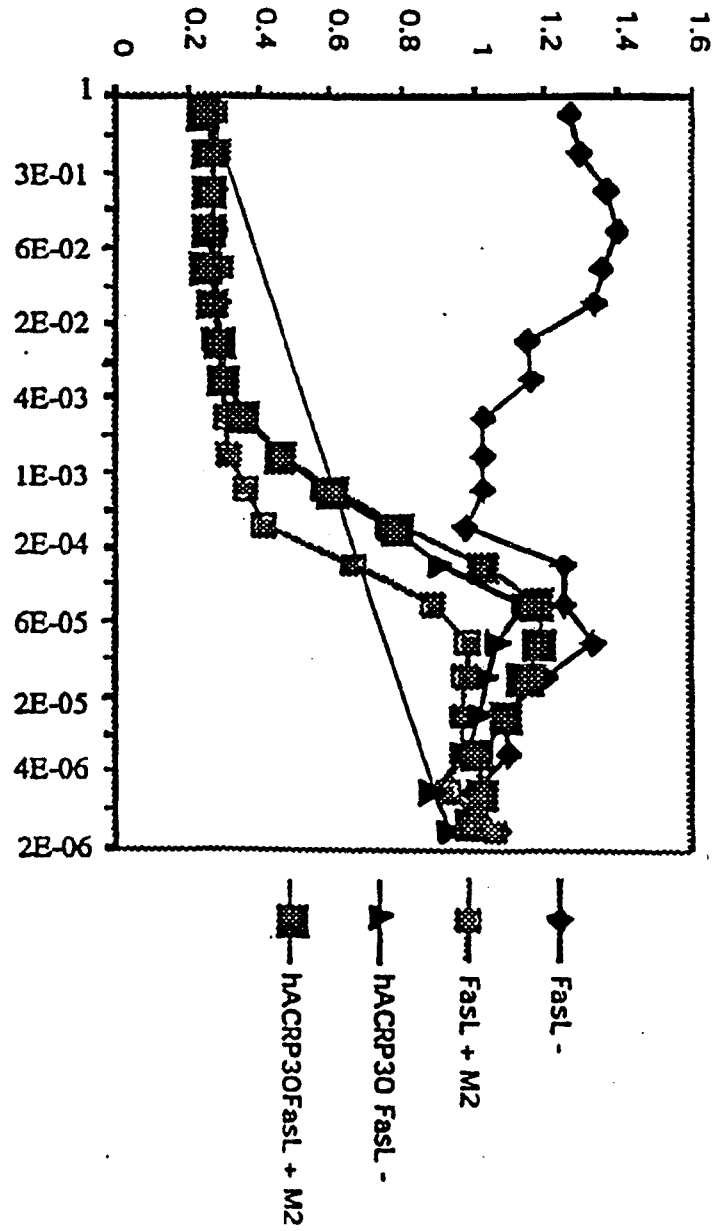
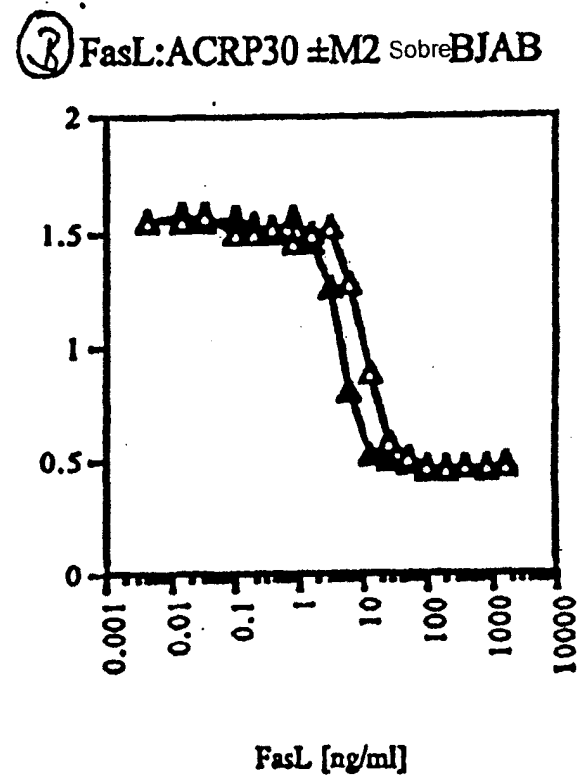
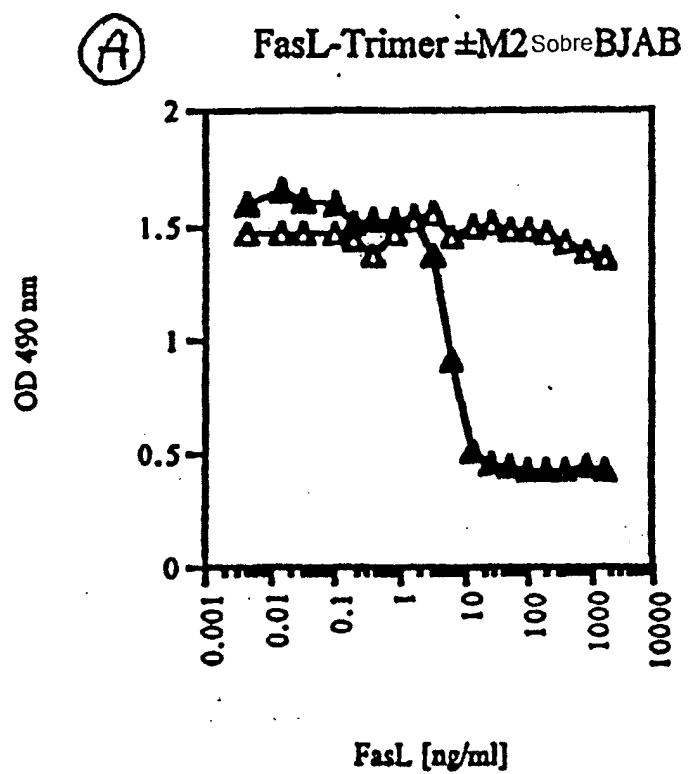


FIG 6c



—▲— +Anticorpo anti-flag M2
 —△— -Anticorpo anti-flag M2

Fig.7

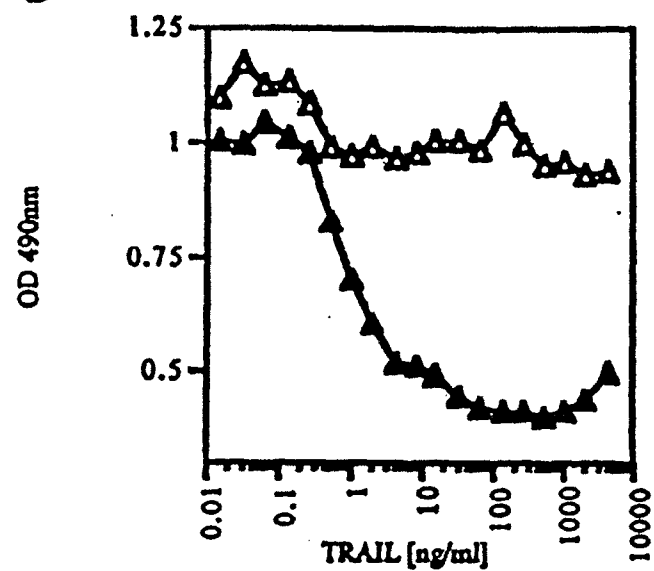
Flag.	Ligador	Ligador específico	hTRAIL aa95-281
(S) TRAIL-ACRP30	DYKDDDDKGGQVQLH	EDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHPCGHNGTPGRDGRDG TPGEKGEKGDAGLLGPKGETGDVGMTGAEGPRGFPGTPGRKGEPGE	LQ TSEETISTVQEKQQNISPLVRERGPQRVAA ITGTRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSW ESSRSCHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFYY IYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYIYK YTSVPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYS IYQGGIFELKENDRIFVSVTNEHLIDMDH EASFFGAFLVG

Linker

Fig.8

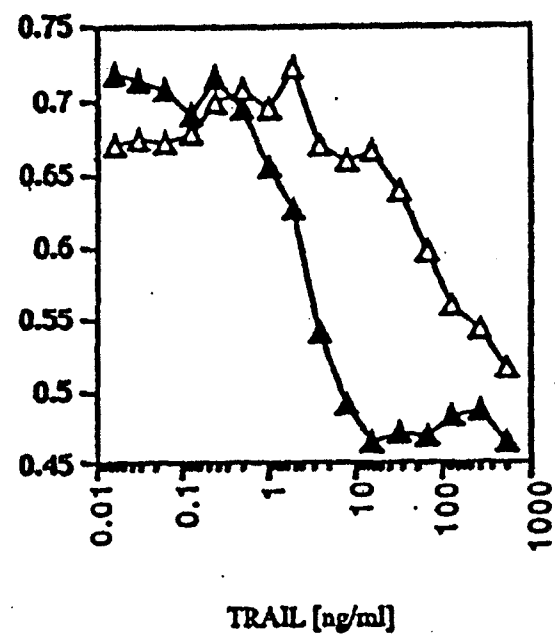
(A)

TRAIL-Trimer $\pm$ M2 Sobre Jurkat



(B)

TRAIL:ACRP30 $\pm$ M2 Sobre Jurkat



▲ +Anticorpo anti-flag M2

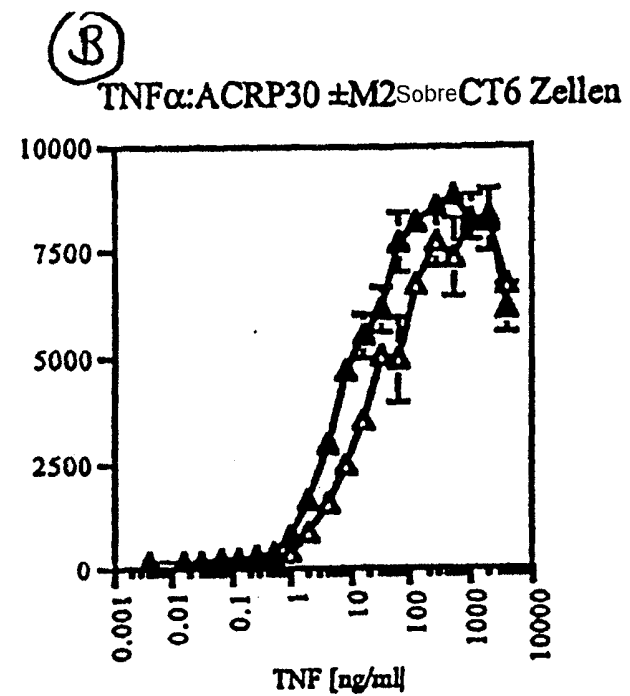
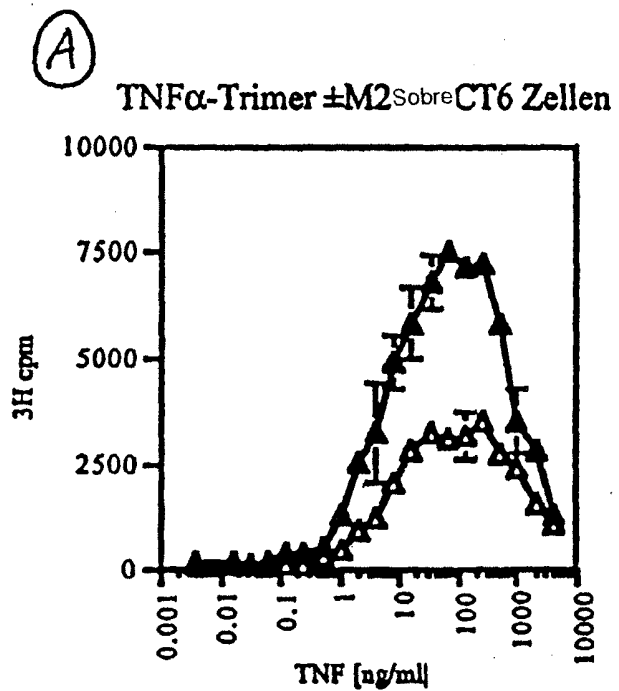
△ -Anticorpo anti-flag M2

Fig. 9

	Flag.	Ligador	Ligador específico	
(6)	TNF α -ACR β 30	DYKDDDDKGGQVQLH	EDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHFGHNGTPGRDGRDG TPGEKGEKGDAGLLGPKGETGDVGMTGAEGPRGFPPTGRKGEPEGLQ	mTNF α aa77-235
				TLTLRSSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLE LSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYL VYSQVLFGQGCPDYVLLTHTVSRFAISY QEKVNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWE PIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFA ESGQVYFGVIAL

Linker

Fig. 10



▲ +Anticorpo anti-flag M2

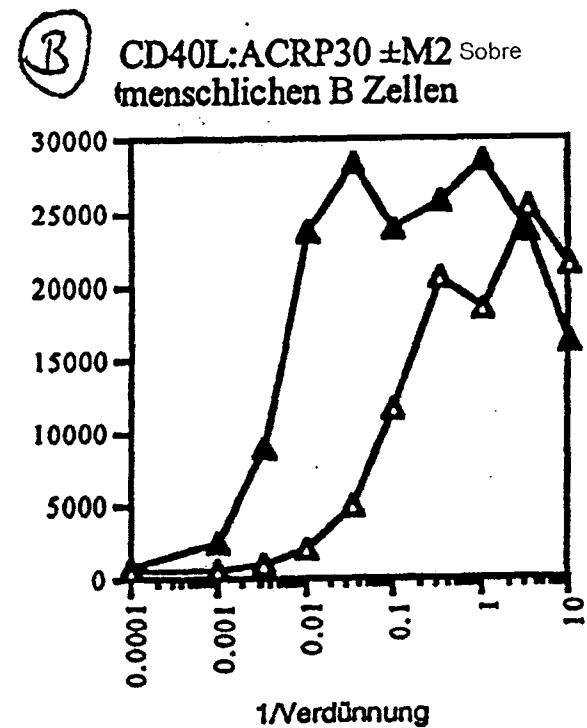
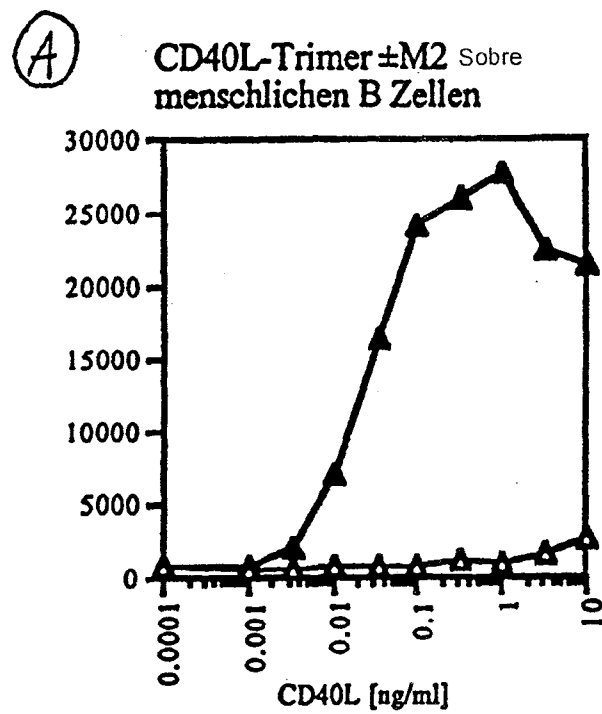
△ -Anticorpo anti-flag M2

Fig.11

	Flag.	Ligador	Ligador específico	
(7)	CD40L-ACRP30DYKDDDDKGPQVQLH	EDDVTTTEELAPALVPPPKGTCAGWMAGIPGHFQHNTPGRDGRDG	TPGEKGEKGDAGLLGPKGETGDVGMTGAEGPRGFPGTPGRKGEPELQ	BCD40L aa116-261
				GDONPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGY
				TMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV
			Linker	TFCSNREASSQAPFIAISLCLKSPGRFERI
				LLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
				GASVFVNVTDPSSQVSEGTGFTSPGLLKL

Fig.12

Fig. 13

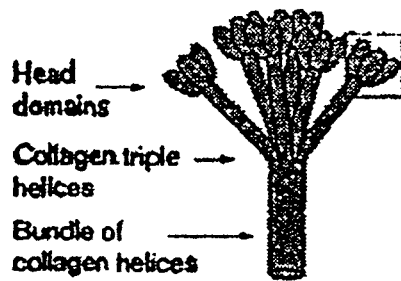


▲ +Anticorpo anti-flag M2

△ -Anticorpo anti-flag M2

(A)

C1q



Komplement protein

6x3 Cadeias
(3 diferentes genes)

(R)

ACRP30



Serum Protein produzido
durch Adipozyten

4x3 Cadeias (1 gene)

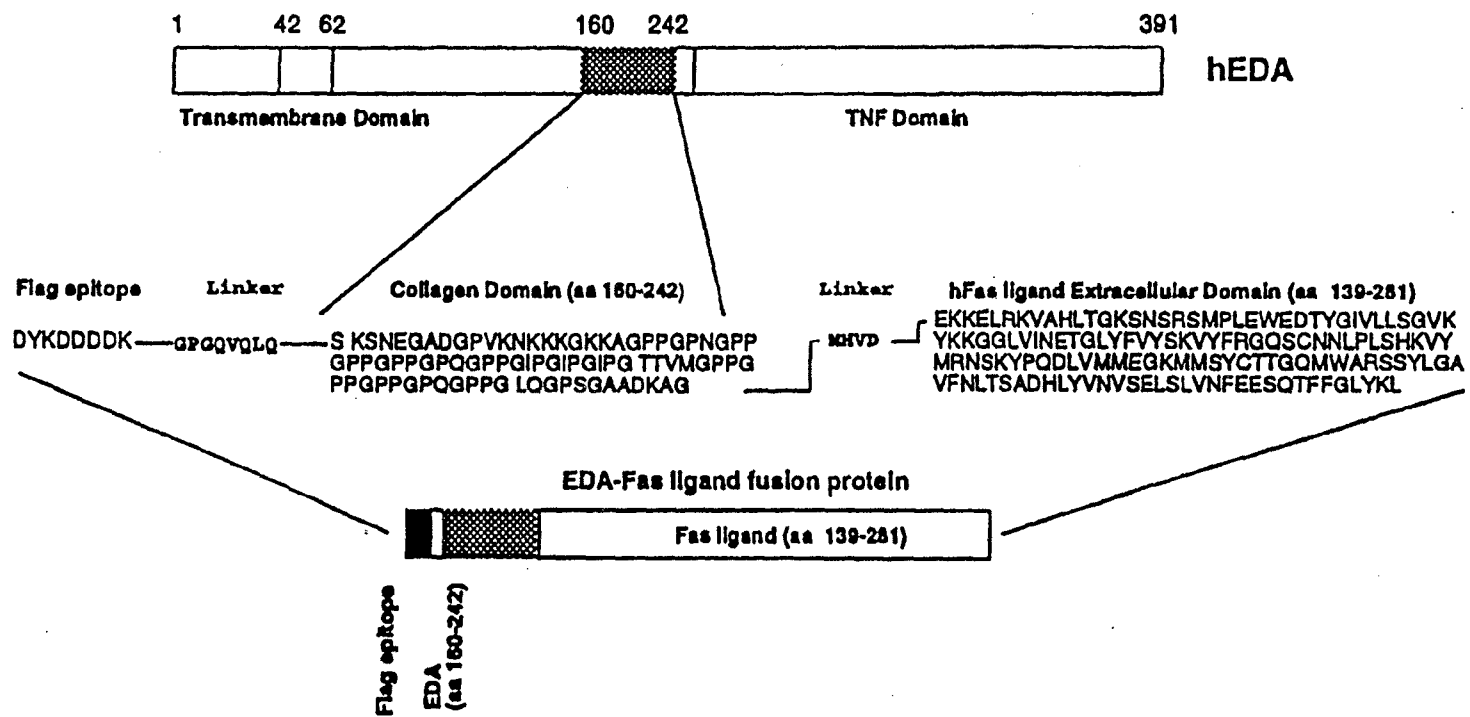
(C)



ACRP30 (TNF ligand)
Membro de família
Proteína de fusão

FIG. 14

FIG. 15A



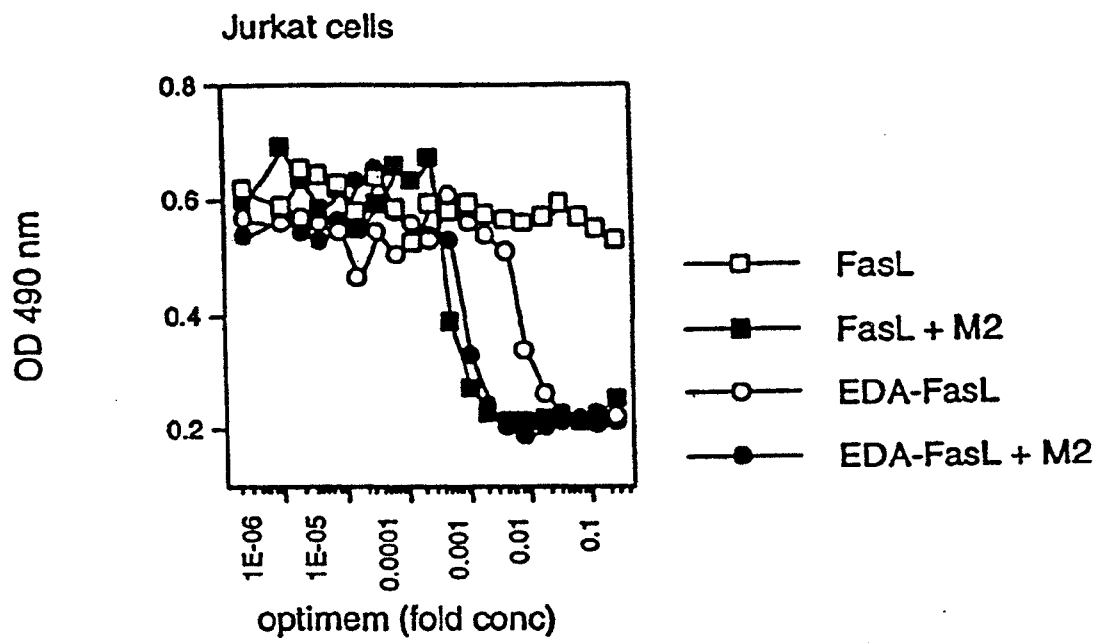


FIG. 15B

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE, OLIGÔMEROS E USO DOS MESMOS, BEM COMO SEQUÊNCIA DE DNA RECOMBINANTE"**.

- 5 A invenção refere-se a oligômeros de um dímero, trímero, quadrômero ou pentâmero de proteínas de fusão recombinantes. Tais oligômeros são caracterizados pelo fato de que as proteínas de fusão recombinantes têm pelo menos um componente A e pelo menos um componente B, sendo que o componente A contém uma proteína ou um segmento de proteína com
- 10 uma função biológica, especialmente com uma função ligante para anticorpos, para moléculas de sinal solúveis ou membranosas, para receptores ou um segmento de anticorpo e o componente B contém uma proteína ou um segmento de proteína que dimeriza ou oligomeriza os dímeros, trímeros, quadrômeros ou pentâmeros da proteína de fusão recombinante, sem a ação
- 15 de moléculas de terça parte. A invenção refere-se também ao uso de dímeros ou oligômeros deste tipo para produzir um medicamento, às proteínas de fusão que se agrupam em dímeros ou oligômeros e às suas seqüências de DNA e vetores de expressão ou células hospedeiras contendo esta seqüência de DNA.