(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321514** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19964741	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.05.11 PCT/US95/05854
(22)	Inng.dag	1996.11.08	(85)	Videreføringsdag	1996.11.08
(24)	Løpedag	1995.05.11	(30)	Prioritet	1994.05.11, IL, 109632 1994.10.02, IL, 111125
(41)	Alm.tilgj	1997.01.09			
(45)	Meddelt	2006.05.15			

(73)	Innehaver	Yeda Research and Development Company Ltd, P O Box 95, 76100 REHOVOT, IL
(72)	Oppfinner	David Wallach, 24 Borochov Street, 76406 REHOVOT, IL Mark Boldin, Moskva, RU Igor Mett, Rehovot, IL Eugene Varfolomeev, Rehovot, IL
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO

(54) Benevnelse **DNA-sekvens som koder for modulatorer for TNF/NGF superfamiliereseptorer, samt protein, farmasøytisk sammensetning, vektor, fremgangsmåter og anvendelser derav.**

(56) Anførte publikasjoner

EP 0 510 691 A1
Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 7, 1992, L. A. Tartaglia and D. V. Goeddel, s. 4304-4307
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, no. april 1991, M. Lewis et. al, s. 2830-2834, spesielt sammendraget og figur 1.

(57) Sammendrag

Det blir beskrevet nye proteiner som binder til de intracellulære områdene av p55 og p75 TNF-R og Fas-R som er i stand til å modulere funksjonen til p55 og p75 TNF-R og Fas-R, og DNA sekvenser som koder for dem. Det blir også beskrevet nye oppløselige oligomere TNF-R, oligomere Fas-R og oligomere reseptorer med en blanding av TNF-R og Fas-R. Det blir også beskrevet fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av alle ovenfor nevnte.

Oppfinnelsens felt

Foreliggende oppfinnelse er generelt innen feltet reseptorer som hører til TNF/NGF superfamilien av reseptorer og kontrollen av deres biologiske funksjoner. TNF/NGF superfamilien av reseptorer omfatter reseptorer slik som p55 og p75 tumornekrose-faktorreseptorer (TNF-R) og FAS ligandreseptorer (også kalt FAS/APO1 eller FAS-R og vil heretter bli kalt FAS-R) og andre. Mer spesifikt, angår foreliggende oppfinnelse nye proteiner som binder til de intracellulære områdene (IC) av p55 og p75 TNF-R og Fas-R (disse intracellulære områdene er henholdsvis angitt p55IC, p75IC og Fas-IC) og hvis nye proteiner er i stand til å modulere funksjonen av p55 og p75 TNF-Rs og Fas-R. Et av proteinene som er i stand til binding av p55IC av det intakte p55-TNF-R er P55IC selv i formen av et p55IC molekyl eller en del derav, slik som for eksempel det såkalte "dødsområdet" (DD) av p55IC. Foreliggende oppfinnelse angår også nye anvendelser Foreliggende oppfinnelse angår også fremstillingen og anvendelsen av disse nye p55 og p75 TNF-F-bindende proteinene og Fas-R bindende proteiner, referert til her som p55 IC-, p75IC- og Fas-IC-bindende proteiner.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Tumornekrosefaktor (TNF-α) og lymfotoksin (TNF-β) (heretter refererer TNF både til TNF-α ogTNF-β) er multifunksjonelle pro-inflammatoriske cytokiner dannet hovedsakelig ved mononukleære fagocytter, som har mange effekter på celler (Wallach, D. (1986) i: Interferon 7 (Ion Gesser, ed.), s. 83-122, Academic Press, London; og Beutler og Cerami (1987)). Både TNF-α og TNF-β initierer deres effekter ved binding til spesifikke celleoverflatereseptorer. Noen av effektene er sannsynligivs fordelaktige for organismen: de kan ødelegge, for eksempel tumorceller eller virøst infuserte celler og øke den antibakterielle aktiviteten til granulocytter. På denne måten bidrar TNF til forsvaret av organismen mot tumorer og infeksiøse midler bidrar til gjenvinning fra skade. TNF kan således bli benyttet som anti-tumormiddel i hvilken anvendelse den binder til dets reseptorer på overflaten av tumorceller og derved initierer hendelsene som fører til død av tumorcellene. TNF kan også bli benyttet som et anti-infeksiøst middel.

Imidlertid har både TNF-α og TNF-β skadelige effekter. Det finnes bevis på at overproduksjon av TNF-α kan spille en viktig patogen rolle i forskjellige sykdommer. Således er effekter av TNF-α primært på vaskulaturen, kjent å være en hovedårsak for symptomene ved septisk sjokk (Tracey et al., 1986). I noen sykdommer kan TNF forårsake stort vekttap (cachexia) ved å undertrykke aktiviteten av adipocytter og ved å forårsake anorexia, og TNF-α ble således kalt cachetin. Det var også beskrevet som en

mediator i skadingen av vev ved reumatiske sykdommer (Beutler og Cerami, 1987) og som en hovedmediator for skaden observert med implantat versus vertreaksjoner (Piquet et al., 1987). I tillegg er TNF kjent å være involvert i inflammasjonsprosessen og i mange andre sykdommer.

To distinkte, uavhengig uttrykte, reseptorer, p55 og p75 TNF-Rs, som binder både TNF-α og TNF-β spesifikt, initierer og/eller medierer de ovenfor angitte biologiske effektene av TNF. Disse to reseptorene har strukturelt forskjellige intracellulære områder, noe som foreslår at de signaliserer forskjellig (Se Hohmann et al., 1989; Engelmann et al., 1990: Brockhaus et al, 1990; Leotscher et al., 1990, Schall et al., 1990; Nophar et al., 1990; Smith et al., 1990; og Heller et al., 1990). Imidlertid har de cellulære mekanismene, for eksempel, de forskjellige proteinene og mulig andre faktorer som er involvert i den intracellulære signaleringen av p55 og p75 TNF-R, enda ikke blitt funnet (som angitt ovenfor er det for første gang beskrevet nye proteiner som er i stand til å binde p75IC og p55 IC). Det er denne intracellulære signaleringen som opptrer vanligvis etter bindingen av liganden, dvs. TNF (α eller β) til reseptoren som er ansvarlig for igangsettingen av kaskaden av reaksjoner som til sist resulterer i den observerte responsen til cellen overfor TNF.

Hva angår den ovenfornevnte cytocidale effekt av TNF, blir denne effekten i de fleste celler studert hittil, hovedsakelig utløst av p55 TNF-R. Antistoffer mot det ekstracellulære området (ligandbindende område) av p55 TNF-R kan selv utløse den cytocidale effekt (se EP 412486) som korrelerer med effektiviteten til reseptortverrbindingen av antistoffer, noe som er ansett å være det første trinn i genereringen av den intracellulære signaliseringsprosessen. Videre har muteringsstudier (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993) vist at den biologiske funksjonen til p55 TNF-R avhenger av integriteten til dets intracellulære område, og følgelig har det vært foreslått at initieringen av den intracellulære signaleringen som fører til den cytocidale effekt av TNF opptrer som en følge av assosieringen av to eller flere intracellulære områder av p55 TNF-R. Videre opptrer TNF (α og ß) som en homotrimer og som sådan har den blitt foreslått å indusere intracellulær signalering via p55 TNF-R ved hjelp av dets evne til å binde til og tverrbinde til reseptormolekyler, dvs. forårsake reseptoraggregering. Her er det nedenfor beskrevet hvordan p55IC og p55DD kan selvassosiere og indusere på en ligandavhengig måte TNF-assosierte effekter i celler.

Et annet medlem av TNF/NGF superfamilen av reseptorer er FAS reseptoren (FAS-R) som også er blitt kalt Fas antigenet, et celleoverflateprotein uttrykt i forskjellige vev og

som deler homologi med et antall celleoverflatereseptorer inkludert TNF-R og NGF-R. FAS-R medierer celledød i form av apoptosis (Itoh et al., 1991) og synes å tjene som en negativ selektor for autoreaktive T celler, dvs. under modning av T celler, FAS-R medierer den apoptopiske død av T celler som gjenkjenner selvantigener. Det har også blitt funnet at mutering i FAS-R genet (*lpr*) forårsaker en lymfoprolifieringsforstyrrelse hos mus som tilsvarer den humane autoimmune sykdom systemisk lupus erythematosus (SLE) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Liganden for FAS-R synes å være celleoverflateassosiert molekyl båret av blant annet killer T celler (eller cytotoksisk T lymfocytter - CTL) og således når slike CTL kontaktceller som bærer FAS-R, er i stand til å indusere apoptisk celledød til FAS-R bærende celler. Videre har et monoklonalt antistoff blitt preparert som er spesifikt for FAS-R, dette monoklonale antistoffet er i stand til å indusere apoptopisk celledød i celler som bærer FAS-R, inkludert musceller transformert med cDNA som koder for humant FAS-R (Itoh et al., 1991).

Det har også blitt funnet at forskjellige andre normale celler ved siden at T lymfocytter uttrykker FAS-R på deres overflate og kan bli avlivet ved utløsning av denne reseptoren. Ukontrollert indusering av en slik avlivingsprosess er mistenkt for å bidra til vevsskade i visse sykdommer, for eksempel destruksjon av leverceller ved akutt hepatitis. Følgelig kan funn av måter å tilbakeholde den cytotoksiske aktiviteten ved FAS-R ha terapeutisk potensial.

I motsetning, da det har blitt funnet av visse maligne celler og HIV-infiserte celler bærer FAS-R på overflaten, kan antistoffer mot FAS-R eller FAS-R liganden bli forårsaket å utløse FAS-R medierte cytotoksiske effekter i disse cellene og derved gi et middel for bekjemping av slike maligne celler eller HIV-infiserte celler (se Itoh et al., 1991). Funnet av enda en måte å øke den cytotoksiske aktiviteten til FAS-R kan således ha terapeutisk potensial.

Det har vært et lenge følt behov å fremskaffe en fremgangsmåte for modulering av den cellulære responsen ovenfor TNF (α eller ß) og FAS-R liganden, for eksempel i patologiske situasjoner som nevnt ovenfor, hvor TNF eller FAS-R liganden blir overekspressert, er det ønskelig å hemme TNF- eller FAS-R ligandinduserte cytocidale effekter, mens i andre situasjoner, for eksempel sårhelingsanvendelser, er det ønskelig å øke TNF-effekten, eller i tilfellet av FAS-R er det i tumorceller eller HIV-infiserte celler ønskelig å øke den FAS-R medierte effekten.

Et antall tilnærminger har blitt gjort av oppfinnerne (se for eksempel europeiske søknader nr. 186833, EP 308378, EP 398327 og EP 412486) for å regulere de skadelige effektene til TNF ved å hemme bindingen av TNF til dets reseptorer ved anvendelse av anti-TNF antistoffer eller ved anvendelse av oppløselige TNF reseptorer (som er hovedsakelig på de oppløselige ekstracellulære områder av reseptorene) for å konkurrere med bindingen av TNF til de celleoverflatebundne TNT-R. Videre, på basis at TNF-bindingen til dets reseptorer er nødvendig for de TNF-induserte cellulæreffektene, har oppfinnerne gjort tilnærminger (se for eksempel EPO 568925) for å modulere TNF effekten ved å modulere aktiviteten til TNF-R. Kort angår EPO 568925 en fremgangsmåte for modulering av signaltransduksjon og/eller spaltingen i TNF-R hvorved peptider eller andre molekyler kan vekselvirke enten med reseptoren selv eller med effektorproteiner som vekselvirke med reseptoren, for således å modulere den normale funksjonen av TNF-R. I EPO 568925 er det beskrevet konstruksjoner og karakteriseringen av forskjellig mutant p55 TNF-R, som har mutasjoner i de ekstracellulære, transmembranale og intracellulære områder av p55 TNF-R. På denne måten blir regioner innenfor de ovenfornevnte områdene av p55 TNF-R identifisert å være essentielle for funksjonen av reseptoren, dvs. bindingen av liganden (TNF) og den påfølgende signaltransduksjon og intracellulær signalering som til sist resulterte i den observerte TNF-effekten på cellene. Videre er det også beskrevet et antall tilnærminger å isolere og identifisere proteiner, peptider eller andre faktorer som er i stand til å binde til forskjellige regioner i de ovenfornevnte områdene av TNF-R, hvis proteiner, peptider og andre faktorer kan være involvert i reguleringen eller moduleringen av aktiviteten av TNF-R. Et antall tilnærminger for isolering og kloning av DNA sekvenser som koder for slike proteiner og peptider; for konstruksjon av ekspresjonsvektorer for produksjon av disse proteiner og peptider, og for fremstillingen av antistoffer eller fragmenter derav som vekselvirker med TNF-R, eller med de ovenforstående proteinene og peptidene som binder forskjellige regioner av TNF-R, er også angitt i EPO 568925. Imidlertid er det ikke gjort noen beskrivelse i EPO 568925 på de faktiske proteinene og peptidene som binder til de intracellulære områdene av TNF-R (for eksempel p55 TNF-R), heller er det ikke gjort noen beskrivelse av gjær to-hybridtilnærmingen for å isolere og identifisere slike proteiner eller peptider som binder til de intracellulære områdene av TNF-R. Tilsvarende har det hittil ikke vært gjort noen beskrivelse av proteiner eller peptider som er i stand til å binde til det intracellulære området av FAS-R.

JBC, Vol. 267, nr. 7, s. 4304 - 4307, 1992, foreslår at aggregering av p55 TNF reseptorens intracellulære domener, ved tilstedeværelsen av et ligand, er en viktig

komponent i signalet for cellulær toksisitet. Det antydes imidlertid ikke at de intracellulære domenene binder i fraværet av ligand.

EP 0510691 fremlegger DNA kodende for FAS. PNAS, Vo. 88, s. 2830 - 2834, 1991, rapporterer om kloningen og ekspresjonen av cDNA av to distinkte murine TNF reseptorer og demonstrerer at en reseptor er artsspesifikk.

Således, når det er ønskelig å hemme effekten av TNF eller FAS-R liganden, vil det være ønskelig å redusere mengden eller aktiviteten av TNF-R eller FAS-R på celleoverflaten, mens en økning av mengden eller aktiviteten av TNF-R eller FAS-R vil være ønskelig når en øket TNF eller FAS-R ligandeffekt er søkt. På denne siden har promotorene for både p55 TNF-R og p75 TNF-R nylig blitt sekvensert og analysert av foreliggende oppfinnere og et antall nøkkelsekvensmotiver har blitt funnet som er spesifikke for forskjellige transkripsjonsregulerende faktorer og som sådan kan ekspresjon av disse TNF-R bli kontrollert ved promotornivået, dvs. inhibering av transkripsjon fra promotorene for en reduksjon i antallet av reseptorer og en økning i transkripsjon fra promotorene for en økning i antallet reseptorer (se IL 104355 og IL 109633 og deres tilsvarende, foreløpig ikke publiserte EP og PCT motparter). Tilsvarende studier angående kontroll av FAS-R ved nivået av promotoren av FAS-R genet har enda ikke blitt rapportert.

Videre må det også bli nevnt at mens det er kjent at tumornekrosefaktor (TNF) reseptorene og den strukturelt-relaterte reseptor FAS-R, utløser i celler etter stimulering av leukocytt-produserte ligander, destruktive aktiviteter som fører til deres egen død, er mekanismen av denne utløsningen enda dårlig forstått. Mutasjonsstudier indikerer at i FAS-R og p55 TNF reseptoren (p55-R) omfatter signalisering for cytotoksisk aktivitet distinkte regioner i deres intracellulære områder (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh og Nagata, 1993). Disse regionene ("dødsområder") har sekvenslikheter. "Dødsområdene" av både FAS-R og p55-R har tendens til selv-assosiering. Deres selv-assosiering fremmer tilsynelatende den reseptoraggregeringen som er nødvendig for initiering av signalisering (som angitt her nedenfor så vel som av Song et al., 1994; Wallach et al., 1994; Boldin et al,. 1995) og ved høye nivåer av reseptorekspresjon kan dette resultere i utløsning av liganduavhengig signalisering (som beskrevet nedenfor og av Boldin et al., 1995).

Det er således ikke før foreliggende oppfinnelse blitt fremskaffet proteiner som kan avregulere effekten av ligandene som hører til TNF/NGF superfamilien, slik som TNF

eller FAS-R ligandeffekten på celler ved mediering av intracellulær signaleringsprosess, hvilken signalering sannsynligvis er styrt til en stort grad av de intracellulære områder (IC) av reseptorer som hører til TNF/NGF superfamilien av reseptorer slik som de av TNF-R, dvs. p55 og p75 TNF-R intracellulære områder (henholdsvis p55IC og p75IC) så vel som FAS-IC.

Følgelig er det et mål ifølge oppfinnelsen å fremskaffe proteiner som er i stand til å binde til de intracellulære områdene av TNF-R og FAS-R, hvis proteiner for tiden er antatt å være involvert i den intracellulære signaleringsprosessen initiert ved binding av TNF til dets reseptorer, eller bindingen av FAS liganden til dens reseptor.

Et annet mål ifølge oppfinnelsen er å fremskaffe antagonister (for eksempel antistoffer) for disse intracellulære områdebindende proteiner (IC-bindeproteiner) som kan bli benyttet for å hemme signaleringsprosessen når ønskelig, når slike IC-bundede proteiner er positive signaleffekter (dvs. induserer signalisering), eller å øke signaliseringsprosessen når ønskelig, når slik IC-bindende proteiner er negative signaleffektorer (dvs. hemmer signalering).

Enda et mål med oppfinnelsen er anvendelsen av slike IC-bindende proteiner for å isolere og karakterisere ytterligere proteiner eller faktorer som eksempelvis kan være involvert videre nedstrøms i signaleringsprosessen, og/eller isolere eller identifisere andre reseptorer videre oppstrøms i signaleringsprosessen til hvilke disse IC-bindende proteinene binder (for eksempel andre TNF-R eller relaterte reseptorer) og således i hvis funksjon de IC-bindende proteinene også er involvert.

Videre er et mål ved foreliggende oppfinnelse rettet mot anvendelsen av de ovenfornevnte IC-bindende proteinene som antigener for fremstillingen av polyklonale og/eller monoklonale antistoffer. Antistoffene kan igjen bli benyttet for rensing av de nye IC-bindende proteinene fra forskjellige kilder, slik som celleekstrakter eller transformerte cellelinjer.

Videre kan disse antistoffene bli benyttet for diagnostiske formål, for eksempel for identifisering av forstyrrelser som er relatert til abnormal funksjon av cellulære effekter mediert av reseptorene som hører til TNF/NGF reseptorsuperfamilien.

Et videre mål ved oppfinnelsen er å fremskaffe farmasøytiske sammensetninger omfattende de IC-bindende proteinene ovenfor og farmasøytiske sammensetninger

omfattende antagonistene for IC-bindende proteinene, for behandlingen eller profylakse av TNF-indusert eller FAS ligandinduserte betingelser, for eksempel kan slike sammensetninger bli benyttet for å øke TNF eller FAS ligandeffekten eller å hemme TNF eller FAS ligandeffekten avhengig av den ovenfor angitte natur av det IC-bindende protein eller antagonisten derav inneholdt i sammensetningen.

Videre, ifølge enda et mål ved oppfinnelsen, blir det beskrevet andre måter å eliminere eller antagonisere endogent dannet eller eksogent administrert TNF eller FAS-R ligand ved anvendelse av oppløselig oligomere TNF-R, oligomere FAS-R eller oligomerer som er en blanding av TNF-R og FASS-R. Hva dette angår, kan det nevnes at et forsøk i denne retning var isoleringen og rekombinant produksjon av et TNF-bindende protein kalt TBP-I som ble vist å være i stand til å antagonisere effektene av TNF. Denne antagonismen ble bestemt ved både måling av reduksjon av den cytotoksiske aktiviteten av TNF så vel som måling av interferensen av TNF binding til dets reseptorer (EP 308 378). TBP-I ble vist å beskytte celler fra TNF-toksisitet ved konsentrasjoner på noen få nanogram pr. ml og å interferere med bindingen av både TNF-α og TNF-ß til celler, når gitt samtidig med disse cytokinene. Videre undersøkelse av mekanismen ved hvilke TBP-I fungerer avslørte at TBP-I ikke vekselvirker med målcellen, men blokkerer heller funksjonen av TNF ved spesifikt å binde TNF, for således å konkurrere med TNF om TNF reseptoren.

Følgelig, med en annen renseteknikk ble nærværet av to aktive komponenter funnet: en, TBP-I, og et andre TNF-bindende protein som ble kalt TBP-II (først beskrevet i EP 398327). Begge proteinene gir beskyttelse mot *in vitro* cytocidal effekt av TNF og begge binder TNF-ß mindre effektivt enn TNF-α. Selvom ifølge SDS PAGE analyse de to proteinene, TBP-I og TBP-II, synes å ha en meget tilsvarende molekylvekt, kan de klart bli adskilt fra hverandre ved mangel av immunologisk kryssreaktivitet, forskjellige N-terminale aminosyresekvenser og forskjellig aminosyresammensetning.

Imidlertid, de ovenfor tidligere nevnte oppløselige TNF bindende proteinene er monomere og er i stand til å binde kun en monomer av TNF homotrimeren, den naturlige liganden som fremdeles tillater TNF aktivitet (dvs. ufullstendig nøytralisering) av TNF enda to aktive monomerer ubundet til TNF bindende proteiner. Videre har det hittil ikke vært beskrevet oppløselige FAS-R (oppløselig FAS-R ligandbindende proteiner) som er i stand til å binde FAS-R ligand som er kjent å være et homotrimert, celleoverflateforbundet molekyl.

Et såkalt "dødsområde" av p55-IC (Tartaglia et al., 1993) har blitt beskrevet, men viste ikke, som ved foreliggende oppfinnelse, at p55-IC og "dødsområdet" av denne selv-assosierer, hvor denne selv-assosieringen er primært ansvarlig for signaleringen som fører til induksjon av cellecytotoksis. Videre er denne publikasjonen taus om muligheten for produksjon av oppløselige, oligomere TNF-R, eller oppløselig, oligomer Fas-R, eller blandede oligomerer derav, dessuten beskriver den ikke andre TNF-forbundne effekter indusert ved p55-IC eller deler derav, for eksempel IL-8 genekspresjoninduksjon, som alle er beskrevet i den foreliggende oppfinnelse. Likeledes beskriver en annen publikasjon, publisert etter prioritetsdatoen for foreliggende oppfinnelse, aggregeringen (dvs. selv-assosieringen) evnen til p55-IC, men angår ikke, som angitt ovenfor, anvndelsen av dette for å fremstille oppløselige, oligomere TNF-R eller Fas-R eller andre TNF-assosierte effekter indusert på en liganduavhengig måte ved p55-IC eller deler derav ifølge oppfinnelsen.

Oppsummering av oppfinnelsen

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det funnet nye proteiner som er i stand til binding til enten det intracellulære området av p55 NTF-R (de p55IC-bindende proteinene) av p75 NTF-R (de p75IC-bindende proteinene) og FAS-R (de FAS-IC-bindende proteinene). Disse p55IC-, p75IC- og FAS-IC-bindende proteinene kan virke som mediatorer eller modulatorer for TNF eller FAS-R ligandaktiviteten på celler ved hjelp av mediering eller modulering av intracellulær signaleringsprosess som vanligvis opptrer etter binding av TNF til p55 og/eller p75 TNF-R, eller bindingen av FAS-R ligand til celleoverflaten. Videre er det overraskende og uventet funnet at p55IC og FAS-IC er i stand til selv-assosiering og at fragmentene av p55IC og FAS-IC er tilsvarende i stand til bindingen til p55 IC, spesielt de såkalte "dødsområder" (DD) i IC av disse reseptorene, dvs. p55DD og FAS-DD. Således representerer p55 IC og FAS-IC og deres fragmenter også proteiner som er i stand til binding til p55IC og FAS-IC og kan således være modulatorer for TNF eller FAS-R ligandaktiviteten på celler.

Videre har naturen til bindingen av et av de nye proteinene ifølge oppfinnelsen, heretter betegnet 55.11 protein, til det intracellulære området av p55-TNF-R, blitt mer fullstendig forklart (se eksempel 1).

Videre, ifølge et annet aspekt, er foreliggende oppfinnelse basert på det funn at det intracellulære området av p55 TNF reseptoren (p55-IC), en region inneholdt deri, det såkalte p55-IC "dødsområdet", det intracellulære området av Fas/APOI reseptoren (Fas-IC), og en region inneholdt deri, det såkalte Fas-IC "dødsområdet" er i stand til selv-

assosiering. Følgelig er det mulig å konstruere ved standard rekombinante DNA teknikker en oppløselig oligomer TNF reseptor som er et fusjonsprodukt inneholdende minst to ekstracellulære områder av en TNF reseptor på dets ene ende, og på den andre enden minst to av de ovenfor angitte selv-assosierende intracellulære områdene eller porsjonene derav som selv-assosierer for å gi en oligomer som har minst to slike fusjonsprodukter bundet sammen. Et slikt oppløselig, oligomert TNF-R er således i stand til binding av to monomeer av naturlig forekommende TNF homotrimer, og er som sådan effektiv i nøytralisering av TNF aktivitet. Nøytraliseringen av TNF aktiviteten er ønskelig i alle de ovenfor nevnte tilstandene hvor TNF blir overprodusert endogent eller blir administrert eksogent i høye doser for å resultere i uønskede bivirkninger. Videre kan den effektive bindingen av TNF av oppløselige oligomere reseptorer ifølge oppfinnelsen også tjene til å tillate binding av eksogent tilsatt TNF og dets påfølgende ønskede sakte frigiving i tilstander hvor TNF blir administrert for dets fordelaktige effekter, for eksempel ved tumorterapi. Likeledes er det også mulig å konstruere standard rekombinante DNA teknikker et oligomert FAS-R som er et fusjonsprodukt inneholdende minst to ekstracellulære områder av et FAS-R ved dets ene ende og ved dets andre ende minst to av de ovenfor nevnte selv-assosierte intracellulære områdene eller porsjoner derav som selv-assosierer for å gi en oligomer som har minst to slike fusjonsprodukter bundet sammen. Et slikt oligomert FAS-R er således i stand til å binde to monomerer av naturlig forekommende FAS-R ligandhomotrimer, og som sådan nøytraliserer effektivt FAS-R ligandaktiviteten. Nøytraliseringen av FAS-R ligandaktiviteten er ønskelig i alle av de ovenfor nevnte tilstandene hvor overskuddsmengder derav er forbundet med uønskede sideeffekter. På tilsvarende måte og i lys av nylige rapporter som indikerer en mulig assosiering mellom TNF og FAS-R ligandinduserte effekter på celler og således også en mulig assosiering, geografisk på celleoverflaten hvor de binder til sine reseptorer, er det også mulig å konstruere ved standard rekombinante DNA teknikker en blandet oligomer reseptor som har spesifitet for både TNF og FAS-R ligand. En slik blandet oligomer vil være en blanding av de ovenfor angitte fusjonsproduktene inneholdende minst et ekstracellulært område av en TNF-R og minst et ekstracellulært område av en FAS-R ved dets ene ende, og ved dets andre ende minst to av de ovenfor nevnte selv-assosierende intracellulære områdene eller porsjoner derav som selv-assosierer for å gi en blandet oligomer som har minst to slike fusjonsprodukter bundet sammen. En slikt blandet oligomer er således i stand til å binde minst en monomer av TNF og en monomer av FAS-R ligand samtidig for derved å redusere eller effektivt nøytralisere TNF og FAS-R ligandaktivitetene ved celleoverflaten i betingelser som angitt ovenfor hvor overskuddsmengder av disse to cytokinene er forbundet med de uønskede cellulæreffekter. Som angitt ovenfor, er FAS-

R liganden vanligvis celleoverflate-assosiert og nylige rapporter beskriver også celleoverflate-assosierte former av TNF. Disse blandede TNF-R/FAS-R oligomerene er således spesielt anvendelige for nøytralisering av TNF og FAS-R ligandaktiviteter på celleoverflaten.

Følgelig fremskaffer foreliggende oppfinnelse en DNA sekvens som koder for et protein som er i stand til å binde ett eller flere av de intracellulære områdene av en eller flere reseptorer som tilhører tumornekrosefaktor/nervevekstfaktor (TNF/NGF) superfamilien av reseptorer.

Spesielt fremskaffer foreliggende oppfinnelse en DNA sekvens valgt blant gruppen omfattende:

(a) en cDNA sekvens avledet fra den kodende regionen av et nativt TNF-R intracellulært områdebindende protein;
(b) DNA sekvenser osm er i stand til hybridisering til et DNA av (a) under moderat stringente betingelser og som koder for et biologisk aktivt TNF-R intracellulært områdebindende protein, og
(c) DNA sekvenser som er degenerert som et resultat av den genetiske koden til DNA sekvensene definert i (a) og (b) og som koder for et biologiskt aktivt TNF-R intracellulære områdebindende protein.

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer også en DNA sekvens valgt blant gruppen omfattende:

(a) en cDNA sekvens avledet fra den kodende regionen av et nativt FAS-R intracellulært områdebindende protein;
(b) DNA sekvenser som er i stand til hybridisering til en cDNA av (a) under moderat stringente betingelser og som koder for et biologisk aktivt FAS-R intracellulært områdebindende protein; og
(c) DNA sekvenser som er degenerert som et resultat av den genetiske koden til DNA sekvenser definert i (a) og (b) og som koder for et biologisk aktivt FAS-R intracellulært områdebindende protein.

I utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse koder DNA sekvensene for p55 TNF-R, p75 TNF-R og FAS-R intracellulært områdebindende proteiner, slik som de som koder for de her betegnede proteinene 55.1, 55.3, 55.11, 75.3, 75.16, F2, F9 og DD11.

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer også et protein eller analoger eller derivater derav som er kodet ved hvilke som helst av de ovenfor nevnte sekvensene ifølge oppfinnelsen, hvor nevnte proteiner, analoger og derivater er i stand til å binde til en eller flere av de intracellulære områdene av ett eller flere TNF-R eller FAS-R. Utførelsesformer av dette aspektet av oppfinnelsen omfatter de her betegnede proteinene 55.1, 55.3, 55.11, 75.3, 75.16, F2, F9 og DD11, deres analoger og deres derivater.

Det blir også ved foreliggende oppfinnelse fremskaffet vektorer som koder for de ovenfor nevnte proteinene ifølge oppfinnelsen som inneholder den DNA sekvensene ovenfor ifølge oppfinnelsen, hvor disse vektorene er i stand til å bli uttrykt i passende eukaryote eller prokaryote vertsceller; transformerte eukaryote eller prokaryote celler inneholdende slike vektorer, og en fremgangsmåte for fremstilling av slike proteiner, analoger eller derivater ifølge oppfinnelsen ved dyrking av slike transformerte vertceller under betingelser som passer for ekspresjonen av nevnte protein, analoger eller derivater, utførelse av post-translasjonell modifikasjon av nevnte protein som nødvendig for oppnåelse av nevnte protein og ekstrahering av nevnte uttrykte proteinanaloger eller derivater fra det cellulære medium av nevnte transformerte celler eller fra celleekstrakter av nevnte transformerte celler.

Oppfinnelsen muliggjør også antistoffer eller aktive derivater eller fragmenter derav som er spesifikke for proteinene, analogene eller derivater derav ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen muliggjør også forskjellige anvendelser av de ovenfor nevnte DNA sekvenser eller proteinene som de koder ifølge oppfifnnelsen, hvis anvendelser blant annet omfatter:

(i) en fremgangsmåte for modulering av TNF eller FAS-R ligandeffekt på celler som bærer et TNF-R eller et FAS-R, omfattende behandling av nevnte celler med ett eller flere proteiner, analoger eller derivater valgt fra gruppen omfattende proteiner, analoger og derivater ifølge oppfinnelsen, og et protein som er p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD analoger eller derivater derav, alle av hvilke proteiner er i stand til å binde til det intracellulære området og modulere aktiviteten av nevnte TNF-R eller FAS-R, hvor nevnte behandling av cellene omfatter innføring av nevnte celler nevnte ett eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form passende for intracellulær administrasjon eller innføring i

nevnte celler i form av en passende ekspresjonsvektor, DNA sekvensen som koder for nevnte ene eller flere proteiner, analoger eller derivater;

(ii) en fremgangsmåte for modulering av TNF eller FAS-R ligandeffekt på celler som bærer en TNF-R eller en FAS-R omfattende behandling av nevnte celler med antistoffer eller aktive derivater eller fragmenter derav ifølge oppfinnelsen;

(iii) en fremgangsmåte for modulering av TNF eller FAS-R ligandeffekten på celler som bærer en TNF-R eller FAS-R omfattende behandling av nevnte celler med en oligonukleotidsekvens som koder for en antisenssekvens av minst en del av sekvensen ifølge oppfinnelsen, eller koder for en antisekvens av p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD sekvensen, hvor nevnte oligonukleotidsekvens er i stand til å blokkere ekspresjon av minst en av de TNF-R eller FAS-R intracellulære områdebindende proteinene;

(iv) en fremgangsmåte for modulering av TNF eller FAS-R ligandaktiviteten på celler som bærer en TNF-R eller FAS-R omfattende:
(a) konstruering av en rekombinant animalsk virusvektor som bærer en sekvens som koder for et viralt overflateprotein som er i stand til å binde til en spesifikk celleoverflatereseptor og en sekvens valgt blant en oligonukleotdsekvens som koder for en antisenssekvens av i det minste en del av sekvensen ifølge oppfinnelsen og en oligonukleotid sekvens som koder for en antisenssekvens av p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD sekvensen, hvor nevnte oligonukleotidsekvens er i stand til å blokkere ekspresjonen av minst et av TNF-R eller FAS-R intracellulært områdebindende proteiner når det blir innført i nevnte celler ved nevnte virus; og
(b) infisere nevnte celler med nevnte vektor av (a),

(v) en fremgangsmåte for modulering av TNF eller FAS-R ligandeffekten på celler som bærer TNF-R eller FAS-R, omfattende behandling av nevnte celler med en passende vektor som koder for et ribozym som har en sekvens spesifikk for en sekvens valgt blant en mRNA sekvens som koder for et protein, en analog eller et derivat ifølge oppfinnelsen og en mRNA sekvens som koder for et protein, en analog eller et derivat derav ifølge oppfinnelsen og en mRNA sekvens som koder for p5IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, hvor nevnte ribozymsekvens er i stand til å vekselvirke med nevnte mRNA sekvens og i stand til å spalte nevnte mRNA sekvens for å resultere i hemming av ekspresjonen av proteinet, analogen

eller derivatet ifølge oppfinnelsen eller av ekspresjonen av p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD,

(vi) en fremgangsmåte for behandling av tumorceller eller HIV-infiserte celler eller andre syke celler, omfattende:
(a) konstruering av en rekombinant animalsk virusvektor bærende en sekvens kodende for et viralt overflateprotein som er i stand til å binde til en tumorcelleoverflatereseptor eller HIV-infisert celleoverflatereseptor eller i stand til å binde til en annen celleoverflatereseptor på andre syke celler og en sekvens valgt blant en sekvens ifølge oppfinnelsen som koder for et protein, en analog eller et derivat ifølge oppfinnelsen og en sekvens som koder for p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD eller en biologisk aktiv analog eller derivat derav, hvor nevnte protein, analog eller derivat ifølge oppfinnelsen, p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD, analog eller derivat, når uttrykt i nevnte tumorcelle eller HIV-infisert celle eller annen syk celle, i stand til å avlive nevnte celle; og
(b) infisere nevnte tumorceller eller HIV-infiserte celler eller andre infiserte celler med nevnte vektor ifølge (a),

(vii) en fremgangsmåte for isolering og identifisering av proteiner, faktorer eller reseptorer som er i stand til binding til de intracellulære områdebindende proteinene ifølge oppfinnelsen, omfattende anvendelse av prosedyren for affinitetskromatografi hvor nevnte protein ifølge oppfinnelsen blir forbundet til den affinitetskromatografiske matriks, nevnte forbundne protein blir brakt i kontakt med et celleektrakt og proteiner, faktorer eller reseptorer fra celleektraktet som binder til nevnte forbundne protein blir så eluert, isolert og analysert;

(viii) en fremgangsmåte for isolering og identifisering av proteiner som er i stand til å binde til de intracellulære områdebindende proteinene ifølge oppfinnelsen, omfattende anvendelse av gjær to-hybridprosedyren hvor en sekvens som koder for nevnte intracellulære områdebindende protein blir utført ved en hybridvektor og en sekvens fra et cDNA eller genomisk DNA bibliotek blir utført ved den andre hybridvektor, vektorene blir så benyttet for å transformere gjær vertceller og de positive transformerte cellene blir isolert, fulgt av ekstrahering av nevnte andre hybridvektor for å oppnå en sekvens som koder for et protein som binder til nevnte intracellulære områdebindende protein; og

(ix) en fremgangsmåte for isolering og identifisering av et protein som er i stand til å binde til de intracellulære områdene av TNF-R eller FAS-R omfattende anvendelse av prosedyren for ikke-stringent sør-hybridisering fulgt av PCR-kloning, i hvilken en sekvens eller del derav ifølge oppfinnelsen blir benyttet som en probe for å binde sekvenser fra et cDNA elelr genomisk DNA bibliotek som i det minste har delvis homologi til dette, hvor nevnte bundne sekvenser så blir forsterket og klonet ved PCR prosedyren for å gi kloner som koder for proteiner som har i det minste delvis homologi til nevnte sekvenser ifølge oppfinnelsen.

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer også en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF- eller FAS-ligandeffekten på celler omfattende, som aktiv ingrediens, en hvilken som helst av de følgende:
(i) et protein ifølge oppfinnelsen, eller proteinet p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, dets biologisk aktive fragmenter, analoger, derivater eller blandinger derav; (ii) en rekombinant animalsk virusvektor kodende for et viralt overflateprotein som er i stand til å binde til en TNF-R eller FAS-R bærende celle, eller tumorcellespesifikk reseptor, og en sekvens som koder for et protein, en analog eller et derivat ifølge oppfinnelse eller koder for p55IC, p55ID, FAS-IC eller FAS-DD; (iii) en rekombinant animalsk virusvektor kodende for et viralt overflateprotein som i (ii) ovenfor og en oligonukleotidsekvens kodende for en antisenssekvens av p55IC, p55ID, FAS-IC eller FAS-DD sekvens; og (iv) en vektor kodende for et ribozym av sekvens som er i stand til å vekselvirke med en mRNA sekvens som koder for et protein, en analog eller et derivat ifølge oppfinnelsen eller en mRNA sekvens som koder for p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD.

Oppfinnelsen muliggjør dermed anvendelsen av p55IC eller DNA som koder derfor. Dette er basert på oppdagelsen av et p55-IC kan på en ligand (TNF)-uavhengig måte indusere andre TNF-assosierte effekter i celler. Følgelig muliggjøres en fremgangsmåte for indusering av TNF-assosierte effekter i celler eller vev omfattnde behandling av nevnte celler med ett eller flere proteiner, analoger eller derivater derav, hvor nevnte ett eller flere proteiner valgt blant et protein som er hovedsakelig hele det selv-assosierende intracellulære området av p55 TNF-R (p55-IC) eller porsjoner derav som er i stand til å selv-assosiere og indusere, på en ligand (TNF)-uavhengig måte, nevnte TNF effekt i cellene, hvor nevnte behandling av cellene omfatter introdusering i nevnte celler av ett eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form som passer for intracellulær introduksjon derav, eller innføring i nevnte celler en DNA sekvens som koder for nevnte

ett eller flere proteiner, analoger eller derivater derav i form av en passende vektor som bærer nevnte sekvens, hvor nevnte vektor er i stand til å effekturere innsetting av nevnte sekvens i nevnte celler på en måte som gjør at nevnte sekvens blir uttrykt i cellene.

Utførelsesformer av metoden ovenfor omfatter:

(i) en fremgangsmåte hvor nevnte behandling av celler er ved transfeksjon av nevnte celler med en rekombinant animalsk virusvektor omfattende trinnene:

(a) konstruering av en rekombinant animalsk virusvektor som bærer en sekvens som koder for et viralt overflateprotein (ligand) som er i stand til å binde til en spesifikk celleoverflatereseptor på overflaten av nevnte celle som skal bli behandlet, og en andre sekvens som koder for et protein som er p55-IC, deler derav, analoger eller derivater av alle de foregående, hvor nevnte protein blir uttrykt i nevnte celler er i stand til selv-assosiering og indusering av nevnte en eller flere TNF-assosiserte effekter; og

(b) infisere nevnte celler med vektoren fra (a),

(ii) en fremgangsmåte hvor nevnte TNF-effekt som skal induseres i nevnte celler, er induksjonen av IL-8 genekspresjon, hvor nevnte vektor bærer en sekvens som koder hovedsakelig for hele p55-IC, deler derav, analoger eller derivater av alle de foregående som er i stand til, når uttrykt i cellene, til selv-assosiering og signalering for induksjonen av nevnte IL-8 genekspresjon,

(iii) en fremgangsmåte for behandling av tumorceller eller viraltinfiserte celler, eller for svekking av den antibakterielle effekt av granulocytter hvor nevnte virale vektor bærer en sekvens som koder for en viral ligand som er i stand til å binde en spesifikk celleoverflatereseptor på overflaten til nevnte tumorceller, viraltinfiserte celler eller granulocytter og en sekvens som koder for nevnte p55-IC, deler derav, analoger og derivater derav, som når uttrykt i nevnte tumor, viraltinfiserte eller granulocyttceller induserer TNF-assosierte effekter som fører til død av disse cellene,

(iv) en fremgangsmåte for behandling av tumorceller hvor nevnte p55-IC, deler derav, analoger eller derivater derav, når uttrykt i tumorceller, induserer ekspresjon av IL-8 som fører til avliving av nevnte tumorceller ved dets kjemotaktiske aktivitet som tiltrekker granulocytter og andre lymfocytter til tumorcellene som resulterer i død av tumorcellene.

Det blir således fremskaffet det intracellulære området av p55-R (p55-IC), deler, analoger og derivater av alle de foregående for anvendelse ved behandling av celler ved indusering deri av TNF-assosierte effekter; og de følgende utførelsesformer derav:

(i) p55-IC, deler, analoger og derivater for anvendelse i behandling av celler ved induksjon deri av IL-8 genekspresjon,

(ii) p55-IC, deler, analoger og derivater for anvendelse ved behandling av tumorceller ved induksjon deri av IL-8 genekspresjon som resulterer i avliving av tumorcellene.

Videre blir det fremskaffet en farmasøytisk sammensetning for behandling av celler ved indusering deri av TNF-assosierte effekter, omfattende, som aktiv ingrediens, p55-IC, deler derav, analoger og derivater av alle de foregående, og en farmasøytisk akseptabel bærer; og de følgende utførelsesformer derav:

(i) en farmasøytisk sammensetning for behandling av celler ved indusering deri av TNF-assosierte effekter omfattende som aktiv ingrediens en rekombinant animalsk virusvektor kodende for p55-IC, deler derav, analoger og derivater derav, og et protein som er i stand til å binde et celleoverflateprotein på cellene som skal behandles,

(ii) en farmasøytisk sammensetning for behandling av tumorceller, hvor administrasjon av nevnte sammensetning fører til induksjon av IL-8 ekspresjon, og påfølgende avliving av tumorcellene.

Foreliggende oppfinnelse muliggjør også en oppløselig, oligomer tumornekrosefaktorreseptor (TNF-R) omfattende i det minste to selv-assosierende fusjonsproteiner, hvor hvert fusjonsprotein har (a) ved dets ene ende en TNF bindende område valgt blant det ekstracellulære området av en TNF-R, analoger eller derivater derav, hvor nevnte ektracellulære området, analoger eller derivater ikke er i stand til skadelig selv-assosiering og som er i stand til å binde TNF; og (b) ved dets andre ende, et selv-assosierende område valgt blant (i) hovedsakelig hele det intracellulære området av p55 TNF-R (p55-IC), som løper fra omkring aminosyrerest 206 til omkring aminosyrerest 426 på det native p55 TNF-R molekyl (p55-R); (ii) dødsområdet av p55-IC som løper fra omkring aminosyrerest 328 til omkring aminosyrerest 426 av det native p55-R; (iii) hovedsakelig hele det intracellulære området av Fas/APO1 reseptor (Fas-IC); (iv) dødsområdet av Fas-IC; og (v) analoger, fraksjoner eller derivater av hvilke

som helst av (i)-(iv) som er i stand til selv-assosiering, hvor nevnte to selv-assosierte proteiner selv-assosierer kun ved endene (b) som har nevnte ender (a) som er i stand til å binde til minst to TNF monomerer, hvor hver ende (a) er i stand til binding til en TNF monomer; og salter og funksjonelle derivater av nevnte oppløselige, oligomere TNF-R.

Varianter av nevnte løselige TNF-R omfatter alle de ovenfor nevnte kombinasjonene av ender (a) med ender (b) som definert ovenfor, for eksempel, en oppløselig, oligomer TNF-R omfattende som ektracellulært område, det p55-R ektracellulære området og som selv-assosierende intracellulært område, p55-IC.

Dessuten kan det tenkes en fremgangsmåte for fremstilling av oppløselig oligomer TNF-R omfattende:

(a) konstruksjonen av en ekspresjonsvektor som koder for en hvilken som helst av nevnte fusjonsproteiner, hvor DNA sekvensen av nevnte ender av fusjonsproteinet blir oppnådd fra klonede DNA sekvenser som koder hovedsakelig for hele det ekstracellulære området av TNF-R, analoger eller derivater derav; og fra klonede DNA sekvenser som koder hovedsakelig for hele av nevnte p55-IC, p55-IC dødsområde, Fas-IC, Fas-IC dødsområde, analoger eller derivater av alle de foregående endene som blir ligert sammen for å danne en fusjonsproteinsekvens, og nevnte fusjonsproteinsekvens blir innsatt i nevnte vektor under kontroll av transkripsjonelle og translasjonelle regulatoriske sekvenser;

(b) innføring av vektoren av (a) i en passende vertcelle i hvilken nevnte fusjonsprotein blir uttrykt; og

(c) rensing av fusjonsproteinet uttrykt i nevnte vertcelle, hvor nevnte fusjonsprotein er selv-assosierende før, under eller etter rensingsprosessen for å gi et oppløselig, oligomert TNF-R.

Videre kan det tenkes en vektor som koder for fusjonsproteinene ovenfor, som er nyttige i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen; vertceller inneholdende vektoren så vel som en farmasøytisk sammensetning omfattende det oppløselige, oligomere TNF-R, salter eller funksjonelle derivater derav og blandinger av hvilke som helst av de foregående ifølge foreliggende oppfinnelse, som aktiv ingrediens, sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer. Tilsvarende blir det fremskaffet oppløselige, oligomere TNF-R salter, funksjonelle derivater derav og blandinger av hvilke som helst av de foregående ifølge

oppfinnelsen, for anvendelse ved antagonisering av skadelige effekter av TNF hos pattedyr, spesielt ved behandling av tilstander hvor et overskudd av TNF blir dannet endogent eller eksogent administrert; eller alternativt, for anvendelse i opprettholdelse av forlengede fordelaktige effekter av TNF hos pattedyr når benyttet med TNF eksogent administrert.

Langs linjene angitt angående aspektet ovenfor, er det blitt oppdaget at det er mulig å konstruere en oppløselig, oligomer Fas/APO1 reseptor (Fas-R) som er anvendelig for antagonisering av skadelige effekter av Fas liganden. Følgelig kan det tenkes en oppløselig, oligomer Fas/APO1 reseptor (Fas-R) omfattende minst to selv-assosierte fusjonsproteiner, hvor hvert fusjonsprotein har (a) ved dets ene ende et Fas ligandbindende område valgt blant det ekstracellulære området av en Fas-R, analoger eller derivater derav som ikke er i stand til selv-assosiering og som er i stand til å binde Fas liganden; og (b) ved dets andre ende et selv-assosierende område valgt blant (i) hovedsakelig hele det intracellulære området av p55 TNF-R (p55-IC) som løper fra omkring aminosyrerest 206 til omkring aminosyrerest 426 i det native p55 TNF-R molekyl (p55-R); (ii) dødsområdet av p55-IC som løper fra omkring aminosyrest 328 til omkring aminosyrerest 426 i det native p55-R; (iii) hovedsakelig hele det intracellulære området av Fas/APO1 reseptor (Fas-IC); (iv) dødsområdet av Fas-IC; og (v) analoger eller derivater av en hvilken som helst av (i)-(iv) som er i stand til selv-assosiering, hvor nevnte minst to selv-assosierende proteiner kun selv-assosierer ved nevnte ender (b) som har ender (a) som er i stand til å binde minst to Fas ligandmonomerer, hver ende (a) er i stand til å binde en Fas ligandmonomer; og salter og funksjonelle derivater av nevnte oppløselige, oligomere Fas-R.

Det blir også fremskaffet en fremgangsmåte for fremstilling av det oppløselige, oligomere Fas-R omfattende:

(a) konstruksjon av en ekspresjonsvektor som koder for en hvilken som helst av nevnte fusjonsproteiner, hvor DNA sekvensen til hver av nevnte ender av fusjonsproteinet blir oppnådd fra klonede DNA sekvenser som koder for hovedsakelig hele nevnte ekstracellulære området av Fas-R, analoger eller derivater derav, og fra klonede DNA sekvenser som koder for hovedsakelig hele nevnte p55-IC, p55-IC dødsområde, Fas-IC, Fas-IC dødsområde, analoger eller derivater derav av alle de foregående, hvor nevnte ender blir ligert sammen for å danne en fusjonsproteinsekvens, og nevnte fusjonsproteinsekvens er satt inn i nevnte vektor under kontroll av transkripsjonelle og translasjonelle regulerende sekvenser;

(b) innføring av vektoren (a) i en passende vertcelle i hvilken nevnte fusjonsprotein blir uttrykt; og

(c) rensing av fusjonsproteinet uttrykt i vertceller, hvor nevnte fusjonsprotein selv-assosierer før, under eller etter rensingsprosessen for å gi et oppløselig, oligomert Fas-R.

Dessuten blir det også fremskaffet en ekspresjonsvektor inneholdende fusjonsproteinsekvensen som koder for det oppløselige, oligomere Fas-R, som er nyttig i fremgangsmåten ovenfor; vertceller inneholdende vektoren og farmasøytiske sammensetninger omfattende det oppløselige, oligomere Fas-R, salter eller funksjonelle derivater derav, eller blandinger av en hvilken som helst av de foregående som aktiv ingrediens sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer. Tilsvarende blir det fremskaffet en oppløselig, oligomer Fas-R, salter eller funksjonelle derivater derav eller blandinger av et hvilket som helst av de foregående for anvendelse ved antagonisering av skadelige effekter av Fas ligand hos pattedyr, spesielt i behandling av tilstander hvor et overskudd av Fas ligand blir dannet endogent eller blir administrert eksogent.

På en tilsvarende måte som angitt ovenfor vedrørende det oligomere TNF-R og oligomere FAS-R, er det også mulig å fremstille blandede oligomerer som har bindingsspesifisitet for både TNF og FAS-R ligand. Således fremskaffer foreliggende oppfinnelse også en blandet oligomer TNF-R/FAS-R som omfatter minst to selv-assosierte fusjonsproteiner, et av hvilke fusjonsproteiner er valgt fra en hvilken som helst av de ovenfornevnte TNF-spesifikke fusjonsproteiner, og det andre fusjonsproteinet er valgt blant et hvilket som helst av de ovenfornevnte FAS-R ligand-spesifikke fusjonsproteinene for å gi en blandet oligomer som har minst et TNF-R ekstracellulært område og minst et FAS-R ekstracellulært område forbundet ved hjelp av selv-assosiering mellom de intracellulære områdene eller deler derav sammensmeltet til hver av de ekstracellulære områdene. Disse blandede oligomere reseptorene blir fremstilt ved fremstilling, som angitt ovenfor, av oligomere TNF-R og oligomere FAS-R og så blanding av disse sammen og påfølgende utvelging ved standard prosedyrer av de oligomerene som har bindingsspesifisitet for både FAS-R ligand og TNF. En annen måte for fremstilling av blandede oligomere reseptorer er ved kotransfektering av passende vertceller med vektorer, som angitt ovenfor, som koder for en hvilken som helst av de TNF-spesifikke fusjonsproteiner (oppløselige TNF-R) og som koder for en hvilken som helst av FAS-R ligand-spesifikke fusjonsproteiner (oppløselig FAS-R), rensing av de uttrykte fusjonsproteinene som selv-assosierer før, under eller etter rensing

for å gi oligomere reseptorer, og så utvelgelse ved standard prosedyrer av de oligomere reseptorene som er i stand til binding til både TNF og FAS-R ligand.

Likeledes blir det også fremskaffet farmasøytiske sammensetninger omfattende blandede oligomere reseptorer, salter eller funksjonelle derivater derav eller blandinger av hvilke som helst av de foregående som aktiv ingrediens sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer. I tillegg blir det fremskaffet blandede oligomere reseptorer, salter eller funksjonelle derivater derav eller blandinger av en hvilken som helst av de foregående for anvendelse i antagonisering av de skadelige effektene av både TNF og FAS-R ligand hos pattedyr, spesielt ved behandling av tilstander hvor et overskudd av TNF og FAS-R ligand blir dannet endogent eller blir administrert eksogent; eller alternativt for anvendelse ved opprettholdelse av forlenget (sakte frigivende) fordelaktige effekter av TNF og/eller FAS-R ligand hos pattedyr når benyttet med TNF og/eller FAS-R ligand (i oppløselig form) administrert eksogent.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en DNA-sekvens som koder for et protein i stand til å binde til et intracellulært domene av en reseptor tilhørende tumornekrosefaktor/nervevekstfaktor (TNF/NGF) –reseptorsuperfamilien, fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av p55 TNF-R, p75 TNF-R og FAS-ligandreseptoren, idet nevnte DNA-sekvens velges fra gruppen bestående av:

(a) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proteinet 55.1 med aminosyresekvensen tilsvarende aminosyreresidium 328 til residium 426 i p55 TNF-R-aminosyresekvens;

(b) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proE6n 55.3 med aminosyresekvensen tilsvarende aminosyreresidium 277 til residium 426 i p55 TNF-R-aminosyresekvensen;

(c) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proteinet 55.11 med aminosyresekvensen gitt i figur 4;

(d) DNA-sekvenser som koder for et protein valgt fra gruppen bestående av de heri designerte proteinene 75.3 og 75.16 omfattende nukleotidsekvensen gitt henholdsvis i figur 1(b) og figur 1(c);

(e) DNA-sekvenser som koder for et hvilket som helst av proteinene F2, F9 og DD11, omfattende en DNA-sekvens valgt fra gruppen bestående av nukleotidsekvensen gitt i henholdsvis første og andre del av figur 10, nukleotidsekvensen gitt i første, andre og tredje del av figur 11 og nukleotidsekvensen gitt i figur 12;

(f) DNA-sekvenser i stand til å hybridisere til en DNA-sekvens ifølge et hvilket som helst av punktene (a) til (e) under moderat stringente betingelser, og

(g) DNA-sekvenser som er degenererte som et resultat av den genetiske koden i forhold til DNA-sekvensene ifølge hvilket som helst av punktene (a) til (f).

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en vektor omfattende en DNA-sekvens i henhold til krav 1.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en transformert eukaryot eller prokaryot vertscelle inneholdende en vektor i henhold til krav 2.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av proteinet, analogene eller derivatene som er i stand til å binde til et intarcellulært domene til en reseptor tilhørende tumornekrosefaktor/nervevekstfaktor (TNF/NGF) – reseptorsuperfamilien, omfattende dyrking av den transformerte vertscellen i henhold til krav 3 under betingelser egnet for ekspresjon av nevnte protein, analoger eller derivater, som forårsaker posttranslasjonsmodifikasjon av nevnte protein som nødvendig for oppnåelse av nevnte protein og ekstraksjon av nevnte uttrykte protein, analoger eller derivater fra kulturmediet til nevnte transformerte celle eller fra celleekstraktene fra nevnte transformerte celle.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse et protein, eller analoger og derivater derav, kjennetegnet ved at det er i stand til å binde til et intracellulært domene til en TNF eller FAS-reseptor kodet av en DNA-sekvens i henhold til krav 1 eller produsert i henhold til fremgangsmåten i krav 4.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av ett eller flere proteiner, analoger eller derivater valgt fra gruppen bestående av proteinene, analogene og derivatene i henhold til krav 5 og et protein som er p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, analoger eller derivater derav, idet alle nevnte proteiner er i stand til å binde til det intracellulære domenet og modulere aktiviteten av nevnte TNF-R eller FAS-R, for

fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler som bærer en TNF-R eller en FAS-R, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning omfatter nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form egnet for intracellulær introduksjon i celler, eller en DNA-sekvens som koder for nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i form av en egnet vektor som bærer nevnte sekvens, idet nevnte vektor er i stand til å forårsake innsetting av nevnte sekvens i nevnte celler på en slik måte at nevnte sekvens uttrykkes i nevnte celler.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av en oligonukleotidsekvens valgt fra en sekvens som koder for en antisenssekvens av minst en del av sekvensen i henhold til krav 1, og en sekvens som koder for antisenssekvensen til p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, idet nevnte oligonukleotidsekvens er i stand til å blokkere ekspresjonen av minst én av de TNF-R eller FAS-R intracellulære domenebindende proteinene for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandvirkningen på celler som bærer en TNF-R eller en FAS-R.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av en rekombinant animalsk virusvektor som bærer en sekvens som koder for et viralt overflateprotein som er i stand til å binde til en spesifikk tumorcelle-overflatereseptor eller HIV-infisert celleoverflatereseptor eller reseptor båret av andre syke celler og en sekvens som koder for et protein, analog eller derivat ifølge krav 5, som, når uttrykt i nevnte tumorcelle, HIV-infiserte celle eller annen sykelig celle er i stand til å drepe nevnte celle, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av tumorceller eller HIV-infiserte celler eller andre sykelige celler.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av ett eller flere proteiner, analoger eller derivater ifølge krav 5, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for induksjon av TNF-assosierte virkninger i celler eller vev, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning som omfatter nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form egnet for intracellulær introduksjon i celler, eller en DNA-sekvens som koder for nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i form av en egnet vektor som bærer nevnte sekvens, idet nevnte vektor er i stand til å forårsake innsetting av nevnte sekvens i nevnte celler på en måte slik at nevnte sekvens uttrykkes i nevnte celler.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av en vektor som koder for en ribozymsekvens i stand til interaksjon med en cellulær mRNA-sekvens som koder for et

protein i henhold til krav 5 eller en mRNA-sekvens som koder for p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD til fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler utformet på en måte som tillater ekspresjon av nevnte ribozymsekvens i nevnte celler, og når nevnte ribozymsekvens uttrykkes i nevnte celler interagerer den med nevnte cellulære mRNA-sekvens og kutter nevnte mRNA-sekvens, resulterende i ekspresjonsinhibering av nevnte protein eller nevnte p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD i nevnte celler.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for isolering og identifisering av proteiner i stand til å binde de intracellulære domenebindende proteinene i henhold til krav 5, omfattende anvendelse av gjær-to-hybridprosedyre hvor en sekvens som koder for nevnte intracellulære domenebindende protein bæres av én hybridvektor og sekvens fra et cDNA eller genomisk DNA-bibliotek bæres av den andre hybride vektoren, vektorene anvendes så til å transformere gjærvertsceller og de positivt transformerte cellene isoleres, fulgt av ekstraksjon av nevnte andre hybride vektor for å oppnå en sekvens som koder for et protein som binder til nevnte intracellulære domenebindende protein.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler omfattende et protein i henhold til krav 5 eller proteinet p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, dets biologisk aktive fragmenter, analoger, derivater eller blandinger derav.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF- eller FAS-R-ligandvirkningen på celler omfattende en rekombinant animalsk virusvektor som koder for et protein i stand til å binde en celleoverflatereseptor og som koder for et protein i henhold til krav 5, eller proteinet p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, dets biologisk aktive fragmenter eller analoger.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandvirkningen på celler omfattende en oligonukleotidsekvens som koder for en antisenssekvens ifølge sekvensen i henhold til krav 1.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et protein ifølge krav 5 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning, for behandling av tumorer.

Andre aspekter og utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er også fremskaffet slik det kommer frem av den følgende detaljerte beskrivelse av oppfinnelsen.

Det må noteres at følgende uttrykt: "Modulering av TNF-effekten på celler" og "Modulering av FAS-ligandeffekten på celler" gjennom hele beskrivelsen er ment å omfatte *in vitro* så vel som *in vivo* behandling.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1a-c angir skjematisk den delvise og preliminære nukleotidsekvensen av cDNA kloner som koder for p55IC og p75IC-bindende proteiner, hvor fig. 1(a) er sekvensen til klone 55.11 som koder for det p55IC-bindende protein 55.11; fig. 1(b) er den delvise og preliminære sekvensen av klone 75.3 som koder for p75IC-bindende protein 75.3; og fig. 1(c) er den delvise og preliminære sekvensen av klone 75.16 som koder for p75IC-bindende protein p75.16; alle som beskrevet i eksempel 1; og fig. 1(d) angir den avledede aminosyresekvensen av protein 55.11, avledet av nukleotidsekvensen i fig. 1(a), som også beskrevet i eksempel 1.

Fig. 2 er en reproduksjon av et Northern blot som viser det 55.11-spesifikke mRNA som er tilstede i et antall av de testede cellelinjer, som beskrevet i eksempel 1.

Fig. 3A og B er reproduksjoner av autoradiogrammer som viser *in vitro* binding av proteinet som er kodet for av 55.11 cDNA til GST fusjonsproteininneholdende deler av p55-IC, hvor i fig. 3A det er angitt bindingen av full-lengde 55.11 proteinet (55.11 full) til forskjellige GST fusjonsproteiner, og i fig. 3B er det angitt bindingen av en del av 55.11 koblet til FLAG oktapeptidet til forskjellige GST fusjonsproteiner, alt beskrevet i eksempel 1.

Fig. 4 viser skjematisk en sammenligning av den avledede aminosyresekvensen av humant 55.11 til relaterte proteinsekvenser avledet fra lavere organismer, som beskrevet i eksempel 1.

Fig. 5 er en reproduksjon av et Western blot farget med anti-MBP polyklonalt antiserum som viser selv-assosieringen av p55IC, Western blot avledet fra en SDS-PAGE gel på hvilken det ble elektroforisert det interakterende bakterielt-produserte chimere proteinet p55IC-MBP og p55IC-GST (spor 1-4) eller kontrollinteraksjonen mellom det chimere protein p55IC-MBP og GST alene

(spor 5-8), interaksjonene mellom de chimere proteinene (og kontroll) som ble utført på glutation-agaroseperler før SDS-PAGE, som beskrevet i eksempel 2.

Fig. 6 er en reproduksjon av fasekontrastmikrografer som viser den cytotoksiske effekten av full-lengde p55IC i HTta1-celler transfektert med en ekspresjonsvektor kodende for dette p55IC (høyre panel); og hemmingen av den cytotoksiske effekten når ekspresjonen av vektoren blir blokkert ved behandling av cellene med tetracyklin (venstre panel), som beskrevet i eksempel 2.

Fig. 7 viser den ligand-uavhengige utløsningen av den cytocidale effekten i HeLa celler transfektert med full-lengde p55-R, dets intracellulære område, eller deler av det intracellulære området inkludert "dødsområdet", hvor:

(i) på ytterste venstre side i fig. 7 er angitt skjematisk de forskjellige DNA molekylene som koder for full-lengde p55-R, dets intracellulære område og deler av det intracellulære området som er innsatt i vektoren hvor HeLa cellene var transfektert;

(ii) den venstre og den midtre stolpen viser TNF reseptorekspresjon i HeLa celler av hver av typene reseptor vist helt til venstre i fig. 7, den venstre stolpen representerer mengdene av reseptor i ng/celleprøve og den midtre stolpen representerer mengdene reseptor uttrykt ved hjelp av radioiodinert TNF bundet til de transfekterte cellene, og

(iii) den høyre stolpen viser levedyktigheten til HeLa cellene som uttrykker de forskjellige typene av reseptor;
og hvor alle søylediagrammene med hvite søyler representerer celler transfektert i nærvær av tetracyklin og skraverte søyler representerer celler transfektert i fraværet av tetracyklin; dette er også beskrevet i eksempel 2.

Fig. 8 viser den ligand-uavhengige induksjon av IL-8 genekspresjon i HeLa celler transfektert med full-lengde p55-R eller dets intracellulære område (p55IC), hvor i panel A der er vist en reproduksjon av et Northern blot som viser Northern-analysen av RNA ektrahert fra HeLa celler behandlet med eller ikke-behandlet med TNF (de to sporene til venstre merket "kontroll" og "TNF"), og RNA ekstrahert fra HeLa celler transfektert med vektorer som koder for p55-R, p55-IC eller kontrollproteinet, luciferase (resten av sporene representerer henholdsvis

"p55-IC", "p55-R" og Luc), hvor cellene som har blitt transfektert i nærvær (+) eller fravær (-) av tetracyklin i hvert tilfelle (således to spor pr. transfeksjon); og hvori i panel B det er vist metylenblåfargingen av 18S rRNA i hver av HeLa celleprøvene vist i panel A; alt det ovenfor er beskrevet i eksempel 2.

Fig. 9 (A og B) angir grafisk den liganduavhengige utløsningen av et cytocidal effekt i HeLa celler transfektert med p55R eller deler derav, eller med AS-IC, hvori fig. 9A det er angitt resultatene med hensyn på p55R eller deler derav, og i fig. 9B er det angitt resultatene med hensyn til FAS-IC. I panelene på venstre side i både fig. 9A og B er det angitt skjematisk andelen av p55R eller FAS-IC benyttet i transfeksjonene, mens panelene til høyre angir grafisk de eksperimentelle resultatene, alt som beskrevet i eksempel 2.

Fig. 10 viser grafisk den partielle og preliminære nukleotidsekvensen av en cDNA klone, kalt "F2", som koder for et protein som er i stand til å binde til p55IC og FAS-IC, som beskrevet i eksempel 3.

Fig. 11 viser grafisk den partielle og preliminære nukleotidsekvensen til en cDNA klone, kalt F9, som koder for et protein som er i stand til binding til p55IC og FAS-IC, som beskrevet i eksempel 3.

Fig. 12 angir skjematisk den partielle og preliminære nukleotidsekvensen til en cDNA klon, kalt DD11, som koder for et protein som er i stand til å binde til p55IC, spesielt p55DD, og FAS-IC, som beskrevet i eksempel 3.

Detaljet beskrivelse av oppfinnelsn

Foreliggende oppfinnelse angår, ifølge et aspekt, nye proteiner som er i stand til å binde til det intracellulære området av reseptorer som hører til TNF/NGF superfamilien, slik som TNF-R og FAS-R og således er ansett som mediatorer eller modulatorer for denne superfamilien reseptorer, for eksempel TNF-R og FAS-R, som har en rolle i eksempelvis signalprosessen som blir initiert ved bindingen av TNF til TNF og FAS liganden til FAS-R. Eksempler på disse proteinene er de som binder til det intracellulære området av p55 TNF-R (p55IC), slik som proteinene betegnet her som 55.1, 55.3 og 55.11 (eksempel 1) så vel som de kodet av cDNA klonene F2, F9 og Dd11 (eksempel 3), de som binder til det intracellulære området v p75 TNF-R (p75IC), slik som proteinene betegnet som 75.3 og 75.16 (eksempel 1); og de som binder til det

intracellulære området av FAS-R (FAS-IC), slik som proteinene kodet ved cDNA klonene F2, F9 og DD11 (eksempel 3). Proteiner 55.1 og 55.3 har blitt funnet å representere deler eller fragmenter av det intracellulære området a p55 TNF-R (p55IC); andre proteiner, 55.11, 75.3 og 75.16, representerer proteiner som ikke er beskrevet i det hele tatt før foreliggende oppfinnelse (75.3, 75.16) eller de som har blitt beskrevet (55.11, se Klan et al., 1992), men hvis funksjon og andre karakteristikker, spesielt evnen til å binde til en TNF-R, ikke var beskrevet på noen måte (se eksempel 1, nedenfor). De nye proteinene kodet ved cDNA klonene F2, F9 og DD11 representerer også proteiner som ikke i det hele tatt var beskrevet før, dvs. deres sekvens er ikke i "GENEBANK" eller "PROTEIN BANK" databanker over DNA eller aminosyresekvenser.

Foreliggende oppfinnelse angår således DNA sekvenser som koder for disse proteinene og proteinene kodet ved disse sekvensene.

Dessuten angår foreliggende oppfinnelse også DNA sekvensene som koder for biologisk aktive analoger og derivater av disse proteinene og analogene og derivatene kodet derved. Fremstillingen av slike analoger og derivater er ved standard prosedyre (se for eksempel Sambrook et al., 1989) i hvilken DNA sekvensene som koder for disse proteine, kan en eller flere koder bli deletert, addert eller substituert av andre, for å gi analoger som har minst en aminosyrerestforandring med hensyn til det native proteinet. Akseptable analoger er de som opprettholder minst kapasiteten ved å binde til det intracellulære området av TNF/NGF reseptorsuperfamilien, slik som FAS-R eller TNF-R, for eksempel p55IC, p75IC eller FAS-IC, eller som kan mediere en hvilken som helst bindende eller enzymatisk aktivitet, for eksempel analoger som binder p55, p75IC eller FAS-IC, men som ikke signalerer, dvs. ikke binder til en videre nedstrømsreseptor, protein eller annen faktor, eller ikke katalyseserer en signalavhengig reaksjon. På en slik måte kan analoger bli produsert som har såkalt dominant-negativ effekt, nemlig en analog som er defekt enten i binding til for eksempel p55IC, p75IC eller FAS-IC, eller i etterfølgende signalering etter slik binding. Slike analoger kan eksempelvis bli benyttet for å hemme TNF- eller FAS-ligandeffekten ved å konkurrere med nøytrale IC-bindende proteiner. Likeledes kan såkalte dominant-positive analoger bli fremstilt som vil tjene til å forsterke, for eksempel, TNF eller FAS ligandeffekten. Disse vil ha like eller bedre IC-bindende egenskaper og de samme eller bedre signaliserende egenskapene som de naturlige IC-bindende proteinene. Tilsvarende kan derivater bli fremstilt ved standard modifikasjoner av sidegruppene på en eller flere aminosyrerester av proteinene, eller ved konjugering av proteinene til det andre molekylet, for eksemel et antistoff, enzym, reseptor etc., som er velkjente innen teknikken.

De nye TNF-R og FAS-R intracellulære områdebindende proteinene, for eksempel proteinene 55.1, 55.3, 55.11, 75.3, 75.16 så vel som proteinene kodet ved cDNA klonene F2, F9 og DD11 (heretter F2, F9 og DD11) har et antall mulige anvendelser, for eksempel:

(i) De kan bli benyttet for å etterligne eller øke funksjonen til TNF eller FAS-R liganden i situasjoner hvor en økt TNF eller FAS-R ligandeffekt er ønsket slik som i anti-tumor, anti-inflammatorisk eller anti-HIV applikasjoner hvor TNF- eller FAS-R ligandindusert cytotoksisitet er ønskelig. I dette tilfellet kan proteinene, for eksempel de som binder til p55IC slik som 5.1, 55.3, så vel som F2, F9 og DD11, og det frie p55IC selv (se nedenfor og eksempel 2), så vel som "dødsområdet" av p55IC (p55DD), som øker TNF effekten; eller proteiner F2, F9 og DD11 så vel som FAS-IC og FAS-DD som øker FAS-R ligandeffekten, dvs. cytotoksisk aktivitet, kan bli introdusert til cellene ved standard prosedyrer kjent per se. For eksempel, ettersom proteinene er intracellulære og det er ønskelig at de blir introdusert kun til cellene hvor TNF eller FAS-R ligandeffekten er ønsket, er et system som er spesifikt for innføring av disse proteinene i cellen nødvendig. En måte for utførelse av dette er ved dannelsen av et rekombinant animalsk virus, for eksempel et avledet fra Vaccinia, til hvilket DNA de følgende to genene vil bli innført: genet som koder for en ligand som binder til celleoverflateproteiner som spesifikt blir uttrykt av cellene, for eksempel en slik som AIDs (HIV) virus gp 120 protein som binder spesifikt til noen celler (CD4 lymfocytter og relaterte hvite blodlegemer) eller en hvilken som helst annen ligand som binder spesifikt til celler som bærer en TNF-R eller FAS-R, slik at den rekombinante virusvektoren vil være i stand til å binde slike TNF-R eller FAS-R-bærende celler; og genet som koder for det nye intracellulære områdebindende proteinet eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD proteinet. Således vil ekspresjon av det celleoverflatebindende proteinet på overflaten av viruset målrette viruset spesifikt for tumorcellen eller andre TNF-R- eller FAS-R-bærende celle, etter hvilket det intracellulært områdebindende proteinkodende sekvensen eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD kodende sekvensen vil bli innført i cellene via viruset, og straks det blir uttrykt i cellene, vil det resultere i en økning av TNF eller FAS-R ligandeffekten som fører til død av tumorcellene eller andre TNT-R- eler FAS-R-bærende celler det er ønskelig å avlive. Konstruksjon av et slikt animalsk virus gjøres ved standard prosedyrer (se for eksempel Sambrook et al., 1989). En annen mulighet er å innføre

seksvensene av de nye proteinene eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD i form av oligonukleotider som kan bli absorbert av cellene og uttrykt der.

(ii) De kan bli benyttet for hemme TNF eller FAS-R ligandeffekten, for eksempel i tilfeller slik som vevsskade under septisk sjokk, graft-vs.-vertsavisning, eller akutt hepatitis, i hvilket tilfelle det er ønskelig å blokkere TNF-induserte TNF-R eller FAS-R ligandindusert FAS-R intracellulær signalering. I denne situasjonen er det mulig eksempelvis å innføre i cellene, ved standard prosedyrer, oligonukleotider som har en anti-senskodende sekvens for disse nye proteinene, eller anti-senskodende sekvens for p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, som effektivt vil blokkere translasjonen av mRNA som koder for disse proteinene og derved blokkere deres ekspresjon og føre til hemming av TNF- eller FAS-R ligandeffekten.

Slike oligonukleotider kan bli innført i cellene ved bruk av den ovenfor nevnte rekombinante virustilnærmingen, hvor den andre sekvensen som er båret av viruset, er oligonukleotidsekvensen. En annen mulighet er å benytte antistoffer som er spesifikke for disse proteinene for å hemme deres intracellulære signaleringsaktivitet. Det er mulig at disse nye proteinene som har et ekstracellulært område så vel som et intracellulært et, kan den siste binde til TNF-R eller FAS-R bindende område, og således kan antistoffer generert til deres ekstracellulære områder bli benyttet for å blokkere deres TNF- eller FAS-R ligandrelaterte funksjoner.

Enda en måte å hemme TNF eller FAS-R ligandeffekten er ved den nylig utviklede ribozymtilnæringen. Ribozymer er katalytiske RNA molekyler som spesifikt spalter RNA. Ribozymer kan bli utformet for å spalte det ønskede mål RNA, for eksempel mRNA som koder for de nye proteinene ifølge oppfinnelsen eller mRNA som koder for p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD. Slike ribozymer vil ha en sekvens som er spesifikk for den aktuelle mRNA og vil være i stand til å vekselvirke med denne (komplementær binding) fulgt av spalting av mRNA for å resultere i en reduksjon (eller fullstendig tap) av ekspresjonen av proteinet det er ønskelig å hemme, hvor nivået av redusert ekspresjon er avhengig av nivået ribozymekspresjon i målcellen. For å innføre ribozymer i de aktuelle cellene (for eksempel de som bærer TNF-R eller FAS-R), kan hvilke som helst passende vektor bli benyttet, for eksempel plasmid, animalsk virus (retrovirus) vektorer, som er vanlig benyttet for dette formålet (se også (i) over,

hvor viruset har som en andre sekvens en cDNA som koder for den aktuelle ribozymsekvensen). Videre kan ribozymer bli konstruert som har multiple mål (flermåls ribozymer) som kan bli benyttet, for eksempel, for å hemme ekspresjonen av ett eller flere av proteinene ifølge oppfinnelsen og/eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD så vel (for oversikter, metoder etc. angående ribozymer se Chen et al., 1992; Zhao og Pick, 1993; Shore et al., 1993; Joseph og Burke, 1993; Shimayama et al. 1993; Cantor et al., 1993; Barinaga, 1993; Crisell et al., 1993 og Koizumi et al., 1993).

(iii) De kan bli benyttet for å isolere, identifisere og klone andre proteiner som er i stand til å binde dem, for eksempel andre proteiner involvert i den intracellulære signaleringsprosessen som er nedstrøms for TNF-R eller FAS-R intracellulære området. I denne situasjon kan disse opsjoner, nemlig DNA-sekvensene som koder dem, bli benyttet i gjær to-hybrid systemet (se eksempel 1 nedenfor) i hvilket sekvensen av disse proteinene vil bli benyttet som "agn" for å isolere, klone og identifisere fra cDNA eller genomiske DNA bibliotek andre sekvenser ("bytter") som koder for proteiner som kan binde til disse nye TNF-R eller FAS-R intracellulære områdebindende proteinene. På samme måte kan det også bli bestemt om de spesifikke proteinene ifølge oppfinnelsen, nemlig de som binder til p55IC, p75IC eller FAS-IC, kan binde til andre reseptorer av TNF/NGF superfamilien av reseptorer. For eksempel har det nylig blitt rapporter (Schwalb et al., 1993; Baens et al., 1993; Crowe et al., 1994) at det eksisterer andre TNF-R ved siden av p55 og p75 TNF-R. Følgelig, ved anvendelse av gjær to-hybrid systemet kan det spesifikt bli testet om proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse er i stand til spesifikt å binde til disse andre TNF-R eller andre reseptorer i TNF/NGF superfamilien. Videre kan denne tilnærmingen også bli benyttet for å bestemme om proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse er i stand til å binde til andre kjente reseptorer i hvilke aktivitet de kan ha en funksjonell rolle.

(iv) De nye proteinene kan også bli benyttet for å isolere, identifisere og klone andre proteiner i de samme klassene, dvs. de som binder til TNF-R eller FAS-R intracellulære områder eller til funksjonelt relaterte reseptorer, og er involvert i den intracellulære signaleringsprosessen. I denne applikasjonen kan det ovenfor angitte gjær to-hybrid systemt bli benyttet, eller der kan bli benyttet det nylig utviklede (Wilks et al., 1989) systemet som benytter ikke-stringent southern hybridisering fulgt av PCR kloning. I Wilks et al.-publikasjonen er det beskrevet

identifikasjonen og kloningen av to putative protein-tyrosin kinaser ved anvendelse av ikke-stringent southern hybridisering fulgt av kloning ved PCR basert på den kjente sekvensen til kinasemotivet, en utviklet kinasesekvens. Denne tilnærmingen kan bli benyttet ifølge foreliggende oppfinnelsen som anvendelse av sekvensene av de nye proteinene for å identifisere og klone de relatert til TNF-R, FAS-R eller relatert reseptor (TNF/NGF superfamiliereseptorer) intracellulære områdebindende proteiner.

(v) Enda en tilnærming til anvendelse av de nye proteinene ifølge oppfinnelsen er å benytte dem i fremgangsmåter for affinitetskromatografi for å isolere og identifisere andre proteiner eller faktorer til hvilke de er i stand til å binde, for eksempel andre reseptorer relatert til TNF-R (TNF/NGF reseptorsuperfamilie) eller andre proteiner eller faktorer involvert i den intracellulære signaleringsprosessen. I denne anvendelsen kan proteinene ifølge oppfinnelsen individuelt være bundet til affinitetskromatografiske matriser og så brakt i kontakt med celleektrakter eller isolerte proteiner eller faktorer som antatt å være involvert i den intracellulære signaleringsprosessen. Etter affinitetskromatografiprosedyren kan proteinene eller faktorene som binder til de nye proteinene ifølge oppfinnelsen, bli eluert, isolert og karakterisert.

(vi) Som notert ovenfor kan de nye proteinene ifølge oppfinnelsen også bli benyttet som immunogener (antigener) for å produsere spesifikke antistoffer. Disse antistoffene kan bli benyttet for rensingsformål av de nye proteinene enten fra celleektrakter eller fra transformerte cellelinjer som produserer dem. Videre kan disse antistoffene bli benyttet for diagnostiske formål for å identifisere forstyrrelser relatert til abnormale funksjoner av TNF eller FAS-R ligandsystemet, for eksempel overaktive eller underaktive TNF- eller FAS-R ligandinduserte cellulæreffekter. Således vil slike forstyrrelser være relatert til feilfunksjonerende intracellulært signaleringssystem som involverer de nye proteinene, og antistoffene vil således tjene som viktige diagnostiske verktøy.

Det må også noteres at isoleringen, identifiseringen og karakteriseringen av de nye proteinene ifølge oppfinnelsen kan bli utført ved anvendelse av en hvilken som helst kjent standard screening-prosedyre. For eksempel ble en av disse screening-prosedyrene, gjær to-hybrid prosedyren som angitt i de følgende eksemplene (eksempler 1 og 3) benyttet for å identifisere de nye proteinene ifølge oppfinnelsen. Likeledes, som angitt ovenfor, kan andre prosedyrer bli benyttet slik som affinitetskromatografi, DNA

hybridiseringsprosedyrer osv. som er velkjente i teknikken, for å isolere, identifisere og karakterisere de nye proteinene ifølge oppfinnelsen eller å isolere, identifisere og karakterisere ytterligere proteiner, faktorer, reseptorer osv. som er i stand til å binde til de nye proteinene ifølge oppfinnelsen eller til reseptorene som hører til TNF/NGF familien av reseptorer.

Hva angår antistoffene nevnt her blir det gjennom det hele med uttrykket "antistoff" ment å omfatte polyklonale antistoffer, monoklonale antistoffer (mAbs), chimere antistoffer, anti-idiotypiske (anti-Id) antistoffer overfor antistoffer som kan bli merket i oppløselig eller bundet form, så vel som fragmenter derav, som er gitt ved en hvilken som helst kjent teknikk slik som, men ikke begrenset til, enzymatisk spalting, peptidsyntese eller rekombinante teknikker.

Polyklonale antistoffer er heterogene populasjoner av antistoffmolekyler avledet fra sera av dyr som er immunisert med et antigen. Et monoklonalt antistoff inneholder en hovedsakelig homogen populasjon av antistoffer spesifikke for antigener, hvis populasjoner inneholder hovedsakelig tilsvarende epitope bindingsseter. MAbs kan bli oppnådd ved fremgangsmåter som er kjent for fagmannen. Se for eksempel Kohler og Milstein, Nature, 256:495-497 (1975); US-patent nr. 4376110; Ausubel et al., utg. Harlow og Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); og Colligan et al., utg. Current Protocols in Immunology, Greene publishing Assoc. og Wiley Interscience N.Y., (1992, 1993), innholdet av hvilke i referanser er innlemmet i sin helhet som referanse. Slike antistoffer kan være av en hvilken som helst immunoglobulinklasse inkludert IgG, IgM, IgE, IgA, GILD og hvilke som helst underklasse derav. En hybridoma som produserer en mAb ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli dyrket *in vitro, in situ eller in vivo*. Produksjon av høye titere av mAbs *in vivo* eller *in situ* gjør dette til den for tiden foretrukne fremgangsmåten av fremstilling.

Chimere antistoffer er molekyler hvor forskjellige deler er avledet fra forskjellige animalske arter, slik som de som har den variable regionen avledet fra et murint mAb og en human immunoglobulin konstant region. Chimere antistoffer er primært benyttet for å redusere immunogenisiteten i anvendelse og å øke utbyttet ved produksjon, for eksempel hvor murint mAbs har høyere utbytter fra hybridomas, men høyere immunogenisitet hos pattedyr, slik at humant/murint chimert mAbs blir benyttet. Chimere antistoffer og fremgangsmåter for deres produksjon er kjent i teknikken (Cabilly et al., *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly et al., europeisk patentansøkning 12023 (publisert 14. november 1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268-270 (1985): Taniguchi et al., europeisk patentansøkning 171496 (publisert 19. februar 1985); Morrison et al., europeisk patentansøkning 173494 (publisert 5. mars 1986); Neuberger et al., PCT-ansøkning WO 8601533 (publisert 13. mars 1986); Kudo et al., europeisk patentansøkning 184187 (publisert 11. juni 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); robison et al., internasjonal patentansøkning nr. WO8702671 (publisert 7. mai 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*84:3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:214-218 (1987); Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988); og Harlow og Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, supra. Disse referanser er i sin helhet innlemmet her som referanse.

Et anti-iodiotypisk (anti-Id) antistoff er et antistoff som gjenkjenner unike determinanter generelt assosiert med antigenbindingssetet til et antistoff. Et Id antistoff kan bli fremstilt ved immunisering av et pattedyr av den samme art og genetiske type (for eksempel musestamme) som kilden av mAb med mAb til hvilket et anti-Id er blitt fremstilt. Det immuniserte dyret vil gjenkjenne og respondere på de idiotypiske determinantene til det immuniserende antistoffet ved fremstilling av et antistoff til disse idiotypiske determinantene (anti-Id antistoff). Se for eksempel US-patent nr. 4699880 innlemmet her i sin helhet som referanse.

Anti-Id antistoffet kan også bli benyttet som et "immunogen" for å indusere en immunrespons i enda et dyr for å produsere et såkalt anti-anti-Id antistoff. Anti-anti-Id kan være epitpisk identisk med det opprinnelige mAb som induserte anti-id. Således ved anvendelse av antistoffer til de idiotypiske determinantene av en mAb, er det mulig å identifisere andre kloner som uttrykker antistoffer med identisk spesifisitet.

Følgelig kan mAbs generert mot IC-bindende proteiner, analoger eller derivater derav ifølge foreliggende oppfinnelse eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD, analoger eller derivater derav bli benyttet for å indusere anti-Id antistoffer i passende dyr, slik som BALB/c mus. Miltceller fra slike immuniserte mus blir benyttet for å produsere anti-Id hybridomas som utskiller anti-Id mAbs. Videre kan anti-Id mAbs bli koblet til en bærer slik som keyhole limpet hemocyanin (KLH) og benyttet for å immunisere ytterligere BALB/c mus. Sera fra disse mus vil inneholde anti-anti-Id antistoffer som har de bindende egenskapene til det opprinnelige mAb spesifikke for en epitop av de ovenfor

nevnte IC-bindende proteinene, analoger eller derivater eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD.

Anti-Id mAbs har således deres idiotypiske epitoper eller "idiotoper" strukturelt tilsvarende epitopen som blir evaluert, slik som GRB protein-α.

Uttrykket "antistoff" er også ment å omfatte både intakte molekyler så vel som fragmenter derav, for eksempel, Fab og $F(ab')_2$, som er i stand til å binde antigen. Fab og $F(ab')_2$ fragmentene mangler Fc fragmentet i det intakte antistoff, fjernes lettere fra sirkulasjon og kan ha mindre ikke-spesifikk vevsbinding enn et intakt antistoff (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)).

Det må noteres at Fab og $F(ab')_2$ og andre fragmenter av antistoffene som er nyttige i foreliggende oppfinnelse, kan bli benyttet for å detektering og kvantifisering av de IC-bindende proteinene eller p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD ifølge fremgangsmåten beskrevet her for intakte antistoffmolekyler. Slike fragmenter blir typisk produsert ved proteolytisk spalting ved anvendelse av enzymer slik som papain (for å produsere Fab fragmenter) eller pepsin (for å produsere $F(ab)_2$ fragmenter).

Et antistoff er sagt å "være i stand til binding" av et molekyl dersom det er i stand til spesifikt å reagere med molekylet for derved å binde molekylet til antistoffet. Uttrykket "epitop" er ment å referere til den del av et hvilket som helst molekyl som er i stand til å bli bundet ved et antistoff som kan også bli gjenkjent ved det antistoffet. Epitoper eller "antigeniske determinanter" består vanligvis av en kjemisk aktiv overflategruppering av molekyler slik som aminosyrer eller sukkersidekjeder og har spesifikke tre-dimensjonale strukturelle karakteristikker så vel som spesifikke ladningskarakteristikker.

Et "antigen" er et molekyl eller en del av et slikt molekyl som er i stand til å bli bundet av et antistoff som ytterligere er i stand til å indusere et dyr å produsere antistoff som er i stand til å binde til et epitop av det antigenet. Et antigen kan ha en eller flere enn en epitop. Den spesifikke reaksjonen referert til ovenfor er ment å indikere at antigenet vil reagere på en høyt selektiv måte, med dets korresponderende antistoff og ikke med et flertall av andre antistoffer som kan være fremkalt av andre antigener.

Antistoffene, inkludert fragmenter av antistoffer som er nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse, kan bli benyttet for kvantitativt eller kvalitativt å detektere IC-bindende proteiner eller p55IC, p55DD, FAS-ID, FAS-DD i en prøve eller å detektere nærværet

av celler som uttrykker IC-bindende proteiner ifølge oppfinnelsen eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD proteinene. Dette kan bli oppnådd ved immunofluorescens-teknikker som benytter et fluorescerende merket antistoff (se nedenfor) koblet med lysmikroskopiske, strømningscytometrisk eller fluorometrisk deteksjon.

Antistoffene (eller fragmenter derav) som er nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet histologisk, som en immunofluorescerens eller immunoelektronmikroskopi for *in situ* deteksjon av IC-bindende proteiner ifølge oppfinnelsen eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD. *In situ* deteksjon kan bli utført ved å fjerne en histologisk prøve fra en pasient og fremskaffe et merket antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse å få en slik prøve. Antistoffet (eller fragmentet) blir fortrinnsvis fremskaffet ved å tilføre eller ved å legge over det merkede antistoffet (eller fragmentet) på en biologisk prøve. Ved anvendelsen av en slik prosedyre er det mulig å bestemme, ikke kun nærværet av de IC-bindende proteinene eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD, men også dets distribusjon i den undersøkte prøven. Ved anvendelse av foreliggende oppfinnelse kan fagmannen lett forstå at en hvilken som helst av flere histologiske metoder (slik som fargeprosedyrer) kan bli modifisert for å oppnå slik *in situ* deteksjon.

Slike analyser for IC-bindende proteiner ifølge foreliggende oppfinnelse eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD, omfatter typisk inkubering av en biologisk prøve, slik som et biologisk fluid, et vevsekstrakt, ferskt høstede celler slik som lymfocytter eller leukocytter, eller celler som har blitt inkubert i vevskulturen, i nærvær av et detekterbart merket antistoff som i stand til å identifisere de IC-bindende proteinene eller p55IC, p55DD, FAS-IC, FAS-DD, og detektere antistoffet ved en hvilket som helst av et antall teknikker som er velkjent i teknikken.

Den biologiske prøven kan bli behandlet med en fastfasestøtte eller bærer slik som nitrocellulose, eller annen fast støtte eller bærer som er i stand til å immobilisere celler, cellepartikler eller oppløselige proteiner. Støtten eller bæreren kan så bli vasket med passende buffer fulgt av behandling med et detekterbart merket antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse som notert ovenfor. Fastfasestøtten eller bæreren kan så bli vasket med bufferen en andre gang for å fjerne ubundet antistoff. Mengden bundet merke på hver faste støtte eller bærer kan så bli detektert ved konvensjonelle midler.

Ved "fastfasestøtte", "fastfasebærer", "faststøtte", "fastbærer", "støtte" eller "bærer" er det ment en hvilken som helst støtte eller bærer som er i stand til å binde antigen eller antistoffer. Velkjente støtter eller bærere omfatter glass, polystyren, polypropylen,

polyetylen, dekstran, nylonamylaser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, gabbros og magnetitt. Naturen til bæreren kan enten være oppløselig til en viss grad eller uoppløselig for foreliggende oppfinnelses formål. Støttematerialet kan ha nærmest en hvilken som helst strukturell konfigurasjon så lenge det koblede molekylet er i stand til binding til et antigen eller antistoff. Således kan støtten eller bærerens være sfærisk, som i en perle, sylindrisk, som den indre overflaten på et testrør, eller den ytre overflaten av en stav. Alternativt kan overflaten være flat slik som et ark, teststripe osv. Foretrukne støtter eller bærere omfatter polystyrenperler. Fagmannen vil forstå hvilke andre passende bærere som er aktuelle for binding av antistoff eller protein, eller vil være i stand til å stille disse ved anvendelse ved rutine-eksperimenter.

Bindingsaktiviteten til et gitt parti antistoff ifølge oppfinnelsen som notert ovenfor, kan bli bestemt ifølge velkjente fremgangsmåter. Fagmannen vil være i stand til å bestemme operative og optimale analysebetingelser for hver bestemmelse ved anvendelse av rutine-eksperimenter.

Andre slike trinn som vasking, røring, rysting, filtrering og lignende kan bli lagt til analysene som vanlig eller nødvendig for den bestemte situasjonen.

En av måtene som antistoffene kan bli detekterbart merket er ved binding av det samme til et enzym og anvendelse av en enzymimmunoanalyse (EIA). Dette enzymet vil igjen, når senere eksponert for et passende substrat, reagere med substratet på en slik måte at det produserer en kjemisk gruppe som kan bli detektert, for eksempel ved spektrofotometrisk, fluormetrisk eller ved visuelle midler. Enzymer som kan være nyttige for detekterbar merking av antistoffet omfatter, men er ikke begrenset til, malathydrogenase, stafylokokkal nuklease, delta 5-steroidisomeras, gjæralkoholdehydrogenase, alfa-glycerofosfatdehydrogenase, triosefosfatisomerase, pepperotperoksidase, alkalisk fosfatase, araparinase, glukoseoksidase, beta-galaktosidase, ribonuklease, urease, catalase, glukose-6-fosfatdehydrogenase, glukoamylase og acetylcholinesterase. Deteksjonen kan bli utført ved kolorimetriske metoder som benytter et kromogent substrat for enzymet. Deteksjon kan også bli oppnådd ved visuell sammenligning av graden av enzymatisk reaksjon av et substrat sammenlignet med tilsvarende fremstilte standarder.

Deteksjon kan bli oppnådd ved anvendelse av en hvilken som helst av en variasjon av andre immunoanalyser. For eksempel, ved radioaktivitetsmerking av antistoffene eller antistoffragmenter, er det mulig å detektere R-PTPase ved anvendelsen av en

radioummunoanalyse (RIA). En god beskrivelse av RIA kan bli funnet i Laboratory, Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, av Works, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978) med spesiell referanse til kapittelet med tittelen "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" av Chard, T., som er innlemmet her som referanse. Den radioaktive isotopen kan bli detektert ved slike midler som anvendelse av en γ teller eller en scintillasjonsteller eller ved autoradiografi.

Det er også mulig å merke et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse med en fluorescerende forbindelse. Når det fluorescerensmerkede antistoffet er eksponert for lys med passende bølgelengde, kan dets nærvær bli detektert på grunn av fluorescens. Blant de vanligvis benyttede fluorescensmerkede merkeforbindelse er fluoresceinisotiocyanat, rodamin, fycoerytrin, pykocyanin, allofykocyanin, o-ftaldehyd og fluoreskamin.

Antistoffet kan også bli detekterbart merket ved anvendelse av fluorescensemitterende metaller slik som ^{152}E, eller andre av lantanidseriene. Disse metallene kan bli festet til antistoffet ved anvendelse av slike metallchelaterende grupper som dietylentriaminpentaeddiksyre (ETPA).

Antistoffet kan også bli detekterbart merket ved kobling av det til en kjemiluminescerende forbindelse. Nærværet av det kjemiluminescerende merkede antistoffet blir så bestemt ved detektering av nærværet av luminescens som opptrer under forløpet av en kjemisk reaksjon. Eksempler på spesielt nyttige kjemiluminescerende merkede forbindelser er luminol, isoluminol, teromatisk akridiniumester, imidazol, akridiniumsalt og oksalatester.

Likeledes kan en bioluminescerende forbindelse bli benyttet for å merke antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse. Bioluminescens er en type chemiluminscens funnet i biologiske systemer hvor et katalytisk protein øker effektiviteten av den kjemiluminescerende reaksjonen. Nærværet av et bioluminescensprotein blir bestemt ved detektering av nærværet av luminescens. Viktige bioluminscerende forbindelser for merkeformål er luciferin, luciferase og aequorin.

Et antistoffmolekyl ifølge foreliggende oppfinnelse kan være tilpasset for anvendelse i en immunometrisk analyse, også kjent som en "two-site" eller "sandwich"-analyse. I en typisk immunometrisk analyse blir en mengde umerket antistoff (eller fragment av antistoff) bundet til en støtte eller bærer og en mengde detekterbart merket oppløselig

antistoff blir tilsatt for å tillate detektering og/eller kvantifisering av det ternære produktet dannet mellom fastfaseantistoffet, antigenet og det merkede antistoff.

Typisk, og foretrukket, omfatter immunometriske analyser "forward"-analyser hvor antistoffet bundet til den faste fasen blir først brakt i kontakt med prøven som blir testet for å ekstrahere antigenet fra prøven ved dannelse av en binær fastfaseantistoff-antigenkompleks. Etter en passende inkuberingsperiode blir den faste støtten eller bæreren vasket for å fjerne resten av fluidprøven inkludert ikke-reagert antigen, hvis noe, og så brakt i kontakt med en oppløsning inneholdende en ukjent mengde merket antistoff (som virker som et "reportermolekyl"). Etter en andre inkubasjonsperiode for å tillate det merkede antistoffet å kompleksdanne med antigenet bundet til den faste støtten eller bæreren gjennom det umerkede antistoffet, blir den faste støtten eller bæreren vasket en andre gang for å fjerne det ikke-reagerte merkede antistoffet.

I en annen type "sandwich"-analyse som også kan være anvendelig med antigenene ifølge oppfinnelsen, blir såkalte "samtidige" og "reverse" analyser benyttet. En samtidig analyse omfatter et enkelt inkuberingstrinn hvor antistoffet bundet til den faste støtten eller bæreren og det merkede antistoffet begge blir tilsatt til prøven som blir testet samtidig. Etter at inkuberingen er fullstendig, blir den faste støtten eller bæreren vasket for å fjerne resten av fluidprøve og ikke-kompleksdannet merket antistoff. Nærværet av merket antistoff forbundet med fast støtte eller bærer blir så bestemt som om det var en konvensjonell "forward" sandwich-analyse.

I den "reverse" analysen blir det benyttet en trinnvis tilsetning først av en oppløsning merket antistoff til fluidprøven fulgt av tilsetning av ikke-merket antistoff bundet til en faststøtte eller bærer etter en passende inkuberingsperiode. Etter en andre inkubering blir den faste fasen vasket på en konvensjonell måte for å frigjøre den for resten av prøven som blir testet og oppløsningen av ikke-reagert merket antistoff. Bestemmelsen av merket antistoff forbundet med en faststøtte eller bærer blir så bestemt som i den "samtidige" og den "forward" analysen.

De nye proteinene ifølge oppfinnelsen kan, straks de er isolert, identifisert og karakterisert ved standard screening-prosedyrer, for eksempel gjær to-hybrid metoden, affinitetskromatografi og andre velkjente fremgangsmåter, bli produsert ved en hvilken som helst standard rekombinant DNA prosedyre (se for eksempel Sambrook et al., 1989) hvor passende eukaryote eller prokaryote vertceller blir transformert ved passende eukaryote eller prokaryote vektorer inneholdende sekvensene som koder for proteinene.

Følgelig omfatter oppfinnelsen også slike ekspresjonsvektorer og transformerte verter for produksjon av proteinene ifølge oppfinnelsen. Som nevnt ovenfor omfatter disse proteinene deres biologisk aktive analoger og derivater og således vektorene som koder for dem også inkludert vektorene som koder for analogene av disse proteinene og de transformerte vertene inkludert de som produserer slike analoger. Derivatene av disse proteinene er derivatene produsert ved standard modifikasjon av proteinene eller deres analoger, produsert ved transformerte verter.

Ifølge et annet aspekt angår oppfinnelsen anvendelsen av det fri intracellulære området av p55 TNR-R (p55IC) eller FAS-R (FAS-IC) eller deres såkalte "dødsområder" til fremstilling av et medikament til behandling av spesifikke lidelser (henholdsvis p55DD eller FAS-DD som et middel for øking av TNF eller FAS-R ligandeffekten på celler, eller på dets eget (se eksempel 2). Hvor det er ønskelig å innføre en TNF- eller FAS-R ligandindusert cytotoksisk effekt i celler, for eksempel cancerceller eller HIV-infiserte celle, kan p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD bli introdusert i slike celler ved anvendelse av de ovenfor angitte (se (i) ovenfor) rekombinante dyrevirus (for eksempel vaccinia) tilnærmingen. Her kan også de native p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, biologisk aktive analoger og derivater eller fragmenter derav, bli benyttet, alle av hvilke kan bli fremstilt som angitt ovenfor.

Likeledes muliggjør foreliggende oppfinnelse også den spesifikke blokkeringen av TNF-effekten eller FAS-R ligandeffekten ved blokkering av aktiviteten av p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, for eksempel antisens oligonukleotider kan bli innført i cellene ved blokkering av ekspresjonen av p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD.

Foreliggende oppfinnelse angår også farmasøytiske sammensetninger omfattende rekombinante dyrevirusvektorer som koder for det TNF-R eller FAS-R intracellulære områdebindende proteinene (inkludert p55IC, p55DD, FAS-IC og FAS-DD), hvilken vektor også koder for et virusoverflateprotein som er i stand til å binde spesifikke målcelle (for eksempel cancerceller) overflateproteiner for å rette innsettingen av de intracellulære områdebindende proteinsekvensene i cellene.

Ifølge et annet aspekt angår foreliggende oppfinnelse også spesifkt effektene av de selv-assosierende intracellulære områdene av p55 TNF reseptor (p55-IC, se eksempel 2). Et eksempel på slike effekter som er en effekt normalt medisert ved TNF binding til dets reseptor og som blir etterlignet med signaleringsaktiviteten til de selv-assosierende p55-IC eller deler derav, er induksjonen av ekspresjon av genet som koder for IL-8.

IL-8 er et cytokin som hører til subklassen av kjemokiner som har primær kjemotaktisk aktivitet, og har blitt vist å spille en nøkkelrolle i kjemotaksisen av granulocytter og andre celletyper forbundet med et antall patologiske tilstander (se for eksempel Endo et al., 1994; Sekido et al., 1993; Harada et al., 1993; Ferrick et al., 1991).

TNF har en fordelaktig aktivitet og blir benyttet som sådan ved behandling for å ødelegge tumorceller og virusinfiserte celler eller for å øke antibakteriell aktiviteter til granulocytter. Imidlertid, som angitt ovenfor, har TNF også uønskede aktiviteter i hvilke tilfeller det er ønskelig å blokkere dets aktivitet, inkludert de situasjone hvor store doser TNF blir benyttet i cancerterapi, antiviral terapi eller antibakteriell terapi.

Følgelig er det ønskelig å være i stand til å rette TNF eller et stoff som er i stand til å etterligne dets fordelaktige aktivitet til cellene eller vevene som er spesifikt ønskelig å behandle.

Ifølge foreliggende oppfinnelse har det blitt funnet at det selv-assosierende intracellulære området av p55-R (p55-IC) kan, på en liganduavhengig måte, etterligne et antall av effektene av TNF, for eksempel "dødsområdet" av p55-IC kan indusere cytotoksiske effekter på celler og at p55-IC kan indusere IL-8 genekspresjon. Således er det mulig å benytte p55-IC for å etterligne TNF funksjon på en seterettet måte, dvs. å innføre p55-IC kun i de celler eller vev det er ønskelig å behandle.

Et annet eksempel på den ovenfor nevnte tilnærming som nevnt ovenfor, er spesifikt å transfektere (transformere) tumorceller eller malignt vev med en DNA molekyl som koder for p55-IC eller en del derav som kan indusere ikke kun cytotoksiske effekter på slike celler eller vev, men også øke disse effektene ved såkalt ko-induksjon av IL-8, som vil resultere i akkumulering ved setet av disse cellene eller vevene av granulocytter og andre lymfocytter, som igjen vil tjene til å ødelegge tumorcellene eller vev. Denne tilnærmingen unngår behovet for administrasjon av store doser TNF med dets forbundne skadende bieffekter.

Ved anvendelse av konvensjoll rekombinant DNA teknologi er det mulig å fremstille forskjellige regioner v p55-IC og å bestemme hvilke region som er ansvarlig for hver TNF-indusert effekt, for eksempel er det funnet at "dødsområdet" er ansvarlig for cytotoksisitet (eksempel 2), og det er allerede fremstilt forskjellige andre konstrukter inneholdende deler av p55-IC, hvilke deler (sammen med deler eller hele dødsområdet)

kan være ansvarlig for andre TNF-effekter, og som kan bli benyttet på en liganduavhengig måte straks den er selv-assosiert for aktivitet, for å indusere disse effektene, for eksempel IL-8 induksjon.

Det må noteres at sekvensen av p55-IC omfatter induksjon av andre TNF-assosierte effekter (for eksempel IL-8 induksjon) kan være forskjellig fra den involvet i cytotoksisitet, dvs. kan omfatte ingen eller kun deler av "dødsområdet" og ha andre sekvensmotiver fra andre regioner av det intracellulære området eller kan være den samme sekvens, forskjellige egenskaper ved sekvensen (samme sekvensmotiv) som blir involvert i induksjonen av forskjellige effekter.

Følgelig, som detaljert ovenfor og nedenfor, kan ekspresjonvektorer inneholdende disse p55-IC delene, analoger eller derivater derav, bli fremstilt, uttrykt i vertceller, renset og testet for deres aktivitet. På denne måten kan et antall slike p55-IC fragmenter som har en eller flere TNF-assosierte aktiviteter bli fremstilt og benyttet på en differentiell måte for behandling av et stort antall patologiske tilstander, for eksempel virale infeksjoner, bakterielle infeksjoner, tumorer osv. I alle disse situasjonene kan den spesifikke aktiviteten bli øket ved innlemming (eller ko-transfeksjon) med p55-IC fragmentet som er ansvarlig for IL-8 genekspresjoninduksjon, tillate den ønskelige IL-8 kjemotaktiske aktiviteten å øke destruksjonen av cellene eller vevene det er ønskelig å ødelegge.

Således, uten administrering systematisk av TNF, er det mulig å indusere dets ønskelige effekter ved spesifikt å innføre hele eller deler av p55-IC i cellene eller vevene det er ønskelig å behandle.

p55-IC kan bli introdusert spesifikt i cellene eller vev det er ønskelig å ødelegge ved en hvilken som helst av de ovenfor nevnte prosedyrene. For eksempel, en måte å gjøre dette er å danne et rekombinant animalsk virus, for eksempel avledet fra Vaccinia, til hvilket DNA de følgende to gener vil bli innført: genet som koder for en ligand som binder til celleoverflateproteinene som spesifikt blir uttrykt ved cellene, for eksempel et slikt som AIDS virus gp 120 protein som binder spesifikt til noen celler (CD4 lymfocytter og beslektede hvite blodlegemer) eller eventuelt andre ligander som binder spesifikt til celler som bærer TNF-R, slik at den rekombinante virusvektoren kan være i stand til å binde til slike TNF-R bærende celler; og genet som koder for p55-IC eller en del derav. Således vil ekspresjonen av celleoverflatebindende protein på overflaten av viruset målrette viruset spesifikt til tumorcellen eller andre TNF-R-bærende celle, etter hvilke p55-IC eller deler derav som koder for sekvensen, vil bli innført i cellen via

viruset og straks uttrykt i cellene vil det resultere i økning av TNF effekt som fører til avlivning av tumorcellene eller andre TNF-R bærende celler det er ønskelig å avlive eller induksjon, for eksempel, av IL-8 som vil føre til celledød. Konstruksjon av slikt rekombinant animalsk virus ved standard prosedyrer (se for eksempel Sambrook et al., 1989). Andre muligheter er å innføre sekvensene av p55-IC eller deler derav i form av oligonukleotider som kan bli absorbert ved cellene og uttrykt deri.

Foreliggende oppfinnelse angår således spesifikt farmasøytiske sammensetninger omfattende de ovenfor nevnte rekombinante animalske virusvektorene som koder for p55-IC eller deler derav, hvis vektor også koder for et virusoverflateprotein som er i stand til å binde spesifikke målcelle (for eksempel cancerceller) overflateproteiner for å rette innsettingen av p55-IC eller deler derav, sekvenser inn i cellene.

Det kan også pekes på nye syntetiske TNF reseptorer som er oppløselige og i stand til oligomerisering for å danne dimere, og muligens også høyere ordens multimere, TNF reseptormolekyler, hvor hver monomere del av disse reseptorene er i stand til å danne en TNF monomer. TNF opptrer naturlig som en homotrimer inneholdende tre aktive TNF monomerer som hver i stand til binding til et enkelt TNF reseptormolekyl, mens TNF reseptorene opptrer normalt som monomere som hver er i stand til binding kun til en av monomerene av det TNF homotrimeriske molekylet. Således, når TNF binder til TNF reseptorene på celleoverflaten, er i stand til binding til tre reseptormolekyler for å resultere i clustering av TNF reseptorene som er antatt å være starten av signaleringsprosessen som til sist utløser den observerte TNF effekten på cellene.

Mens TNF har mange ønskede effekter slik som muligheten til å ødelegge, for eksempel, tumorceller eller virusinfiserte celler og å øke antibakterielle aktiviteter til granulocytter, har imidlertid TNF mange uønskede effekter slik som, for eksempel, i mange alvorlige sykdommer inkludert autoimmune sykdommer, reumatoid arthritis, graft-versus-vertreaksjon (implantatavvisning), septisk sjokk, har TNF blitt involvert som hovedårsak for den patologiske vevsødeleggelsen. TNF kan også forårsake stort vekttap (cachexia) ved å undertrykke aktivitetene av adipocytes. Imidlertid, selv når adminstrert for det ønskede aktivitet, for eksempel for behandling av forskjellige maligne eller virale sykdommer, er doseringen av TNF som blir benyttet, ofte høy nok til å forårsake et antall uønskede bieffekter hos pasienten, for eksempel destruksjon av sunt vev.

Følgelig, i alle av de ovenfor nevnte tilfellene hvor TNF virkning er uønsket, har det vært søkt etter en effektiv hemmer for TNF. Mange TNF blokkerende midler har vært foreslått, inkludert oppløselige proteiner som er i stand til å binde TNF og hemme dets binding til dets reseptorer og således hemme de cytotoksiske effektene av TNF (se EP 308378, EP 398327 og EP 568925). Imidlertid er disse TNF bindende proteinene, eller oppløselige TNF reseptorer, monomere som hver binder kun en TNF monomer av TNF homotrimeren. Således kan blokkeringen av TNF funksjonen ikke være fullstendig da hvert monomere reseptorbundet TNF molekyl fremdeles har to TNF monomerer som er fritt i stand til å binde celleoverflate TNF reseptorer og gi dets effekter på cellene.

For å overvinne de ovenfor nevnte ulempene ved blokkering av TNF funksjon har det blitt utviklet midler for konstruksjon, som fusjonsproteiner, oppløselige oligomere TNF reseptorer som er i stand til binding av minst to TNF monomerer av naturlig forekommende TNF homotrimermolekyl. Som en konsekvens binder disse oppløselige TNF reseptorene sterkere til deres TNF ligand enn tidligere kjente monomeroppløselige TNF bindende proteiner eller reseptorer. For eksempel, når den oppløselige TNF reseptor ifølge oppfinnelsen er i form av en dimer, er den i stand til å binde to TNF monomerer av en TNF trimer og således forårsake en mer fullstendig nøytralisering av TNF, hvor nøytraliseringen er mer standhaftig på grunn av lavere dissosiasjonsrate for de dimere oppløselige reseptorene fra TNF. Videre er slike oppløselige, oligomere reseptorer også større enn deres monomere motparter og således har de farmasøytisk også fordeler på grunn av sannsynligheten av at de har en saktere utskillingshastighet fra kroppen.

Basis for utviklingen av de oppløselige oligomere TNF reseptorene var oppdagelsen at det intracellulære området av p55-R TNF reseptoren var i stand til selv-assosiasjon og videre at innen dette intracellulære området (p55-IC) eksisterer det en region, det såkalte "dødsområdet", som også er i stand til selv-assosiering og som sådan på en liganduavhengig måte, kan forårsake cytotoksiske effekter på cellene (se eksempel 2). Ved anvendelse av denne selv-assosiasjonsegenskapen til p55-IC og dets "dødsområde" er det således mulig å konstruere et fusjonsprotein ved anvendelse av standard rekombinant DNA teknologi inneholdende hovedsakelig hele det ektracellulære området av en TNF reseptor slik som p75-R eller p55-R reseptorer, fortrinnsvis p55-R, og sammensmeltet med dette, hovedsakelig hele det ekstracellulære området (p55-IC) eller dødsområdet av p55-IC. På denne måten ble det produsert et nytt fusjonsprodukt som på sin ene ende har det TNF bindende området, dvs. det ekstracellulære området av reseptoren, og på dets andre ende det intracellulære området eller dødsområdet derav

som er i stand til selv-assosiering. Følgelig kan et slikt produkt oligomerisere ved selv-assosiasjon mellom to (og muligens flere) p55-IC eller dødsområder derav for å gi oligomerer (eller i det minste dimerer) som har minst to TNF bindende områder.

Videre har det også blitt oppdaget at Fas/APO1 reseptoren har et selv-assosierende, intracellulært område inklusivt et selv-assosierende "dødsområde" som har en viss homologi med p55-IC og dødsområdet derav (eksempel 2). Følgelig er det mulig å konstruere de oppløselige, oligomere TNF reseptorene ved sammensmelting av det ekstracellulære området av TNF reseptoren (som angitt ovenfor) til det intracellulære området eller "dødsområdet" av Fas/APO1 reseptoren.

I begge av de to ovennevnte situasjonene er de oligomere TNF reseptorene oppløselige ved at de kun har det oppløselige ekstracellulære området av TNF reseptoren og det oppløselige intracellulære området eller dødsområdet derav av enten p55-R TNF reseptoren eller Fas/APO1 reseptoren, dvs. de inneholder ikke det transmembrane (uoppløselige) området av noen av disse reseptortypene.

Konstruksjonen av de ovenfor nevnte oligomere TNF reseptorene er beskrevet i detalj nedenfor i eksempel 4. Det må imidlertid noteres at etter konstruksjon av de oligomere TNF reseptorene, kan det oppstå en situasjon som ikke tidligere er rapportert, dvs. at det ekstracellulære området av TNF reseptoren er i stand til selv-assosiering, en situasjon som ikke er ønskelig da den kan forstyrre med evnen av den oligomere reseptoren til å binde til to eller flere TNF monomerer av de TNF homotrimere molekyler eller føre til mindre enn optimal binding av slike TNF monomerer. Følgelig er det mulig i en slik situasjon ved standard rekombinante DNA prosedyrer å modifisere det ekstracellulære området av TNF reseptoren ved, for eksempel, deletering eller substituering av en eller flere aminosyrerester inneholdt i den selv-assosierende region for å forhindre slik selv-assosiering. Slike modifikasjoner av det ekstracellulære området av TNF reseptoren er således del av den foreliggende oppfinnelse og er angitt her som analoger eller derivater av det ekstracellulære området av TNF reseptoren. På en tilsvarende måte kan det selv-assosierende intracellulære området (IC) eller dødsområdet (DD) derav av p55-reseptoren eller Fas/AP1 reseptoren benyttet i de oligomere TNF reseptorene, også være analoger eller derivater derav, dvs. kan være en hvilken som helst modifikasjon av p55-IC sekvensen eller deler derav inkludert dødsområdet (p55DD), eller en hvilken som helst modifikasjon av Fas/APO1 intracellulære område (FAS-IC) sekvensen eller deler derav inkludert dødsområdet (FAS DD) forutsatt at disse modifikasjonene gir et selv-assosierende produkt.

Tilsvarende, straks produsert og renset, kan de oppløselige oligomere TNF reseptorene, analogene eller derivatene derav, bli ytterligere modifisert ved standard kjemiske midler for å gi salter og funksjonelle derivater derav for formålet for preparering av farmasøytiske sammensetninger inneholdende som aktive ingredienser disse TNF reseptorene.

For produksjon av de oppløselige, oligomere TNF reseptorene blir DNA sekvensene som koder for det ekstracellulære området av TNF reseptoren oppnådd fra eksisterende kloner av hele TNF reseptoren, således blir det intracellulære området av dødsområdet derav, og er også det intracellulære området eller dødsområdet av Fas/APO1 reseptoren (se eksempel 2 og eksempel 5). På denne måten blir DNA sekvensen av det ønskede ekstracellulære området ligert til DNA sekvensen av det ønskede intracellulære området eller del derav inkludert dødsområdet, og dette sammensmeltede proteinet blir satt inn (og ligert) i en passende ekspresjonsvektor under kontroll av promotoren og andre ekspresjonskontrollerende sekvenser. Straks dannet, blir ekspresjonsvektoren introdusert (transformasjon, transfeksjon osv.) inn i en passende vertcelle som så uttrykker vektoren for å gi fusjonsproduktet ifølge oppfinnelsen som er de oppløselige selv-assosierende TNF reseptormolekylene. Disse blir så renset fra vertcellene ved standard prosedyrer for å gi det endelige produktet som er de oppløselige, oligomere TNF reseptorene.

Det foretrukne preparatet av fusjonsproduktet som koder for det ekstracellulære området og det intracellulære området eller deler derav, er ved hjelp av PCR teknologi ved anvendelse av oligonukleotider som er spesifikke for de ønskede sekvensene som skal kopieres fra klonene som koder for hele TNF reseptormolekylet. Andre midler er også mulige, slik som isolering av de ønskelige delene som koder for det ekstracellulære området og det intracellulære området, ved restriksjonsendonukleaser og så spleising av disse sammen på en kjent måte, med eller uten modifikasjoner ved de terminale endene av restriksjonsfragmentene for å sikre korrekt fusjon av de ønskede delene av reseptoren (ekstracellulære og intracellulære områder eller deler derav). De således oppnådde fusjonsproduktene blir så satt inn i den ønskede ekspresjonsvektoren.

På en tilsvarende måte muliggjøres også oppløselige, oligomere Fas/APO1 (FAS) reseptorer inneholdende det ekstracellulære området av Fas/APO1 reseptoren og det selv-assosiserende intracellulære området av p55-R (p55-IC), dødsområdet derav (p55DD), eller det selv-assosierende intracellulære området av Fas/APO1 reseptoren

(FAS-IC) eller dødsområdet derav (FAS DD), eller hvilke som helst analoger eller derivater derav (se ovenfor). Konstruksjonen av disse oppløselige, oligomere FAS reseptorene er beskrevet i detalj i eksempel 5 nedenfor, ved hjelp av en tilgjengelig klonet full-lengde FAS reseptorkodende sekvens som startmateriale og de passende oligonukleotidene for PCR produksjon av de ønskede ekstracellulære og intracellulære områdene, fulgt av ligering derav for å gi et fusjonsprodukt som så kan bli satt inn en passende ekspresjonsvektor. Som angitt ovenfor og under, kan prokaryote eller eukaryote vektorer og vertceller bli benyttet for å produsere de ønskede, oligomere FAS reseptorene, som så kan bli renset og formulert, som aktiv ingrediens, i en farmasøytisk sammensetning.

De ovenfor nevnte oppløselige, oligomere FAS reseptorene er ment for effektiv blokkering av Fas liganden, som også eksisterer som en trimer (tilsvarende til TNF, se ovenfor), hvor hver oligomer reseptor er i stand til å binde to eller muligens flere Fas ligander og derved nøytralisere deres aktivitet. Fas liganden er kjent å være hovedsakelig celleoverflateassosiert, men kan også eksistere i en oppløselig form. I ethvert tilfelle kan de oligomere FAS reseptorene binde i det minst to monomerer av denne liganden og derved nøytralisere mer effektivt (enn monomere FAS reseptorer) aktiviteten til Fas liganden. Fas liganden, og således aktivering derved av FAS reseptoren, har blitt sett i sammenheng med et antall patologiske tilstander, spesielt de som angår leverskade (apoptosis av hepatocytter, for eksempel), omfatter leverskade forbundet med hepatitis, så vel som i autoimmune tilstander, inkludert lymfocyttskade (apoptosis) hos HIV-infiserte mennesker (se for eksempel Ogasawara et al., 1993, Cheng et al., 1994). Følgelig er de oppløselige, oligomere FAS reseptorene ment for blokkering av aktiviteten til Fas liganden og kan bli benyttet som aktiv ingrediens i farmasøytiske sammensetninger for behandling av slike Fas ligand-forbundne patologiske tilstander.

Likeledes muliggjøres også oppløselige, oligomere reseptorer som har bindingsaffinitet for både TNF og FAS-R ligand, de såkalte "blandede" TNF-R/FAS-R oligomere reseptorene. Disse blandede oligomere reseptorene vil inneholde minst et TNF-R ekstracellulært område og minst et FAS-R ekstracellulært område som er forbundet med den oligomere reseptoren ved hjelp av hvert av disse ekstracellulære områdene som er sammensmeltet til et hvilket som helst av de ovenfor nevnte, selv-assosierende p55IC, p55DD, FAS IC eller FAS DD.

Disse blandede oligomere reseptorene kan bli fremstilt ved: (a) fremskaffelse av et hvilket som helst av ovenfor angitte fusjonsproduktene som inneholder det ekstracellulære området av et TNF-R (p75 TNF-R eller fortrinnsvis p55 TNF-R) sammensmeltet til en hvilken som helst av de selv-assosierende intracellulære områdene p55 IC og FAS IC eller et hvilket som helst av de selv-assosierende "dødsområdene" p55DD og FAS DD, eller selv-assosierende deler, analoger eller derivater derav; (b) fremskaffelse av et hvilket som de ovenfor angitte fusjonsproduktene som inneholder det ekstracellulære området av FAS-R sammensmeltet med et hvilket som helst av de selv-assosierende P55IC, FAS-IC, p55DD og FAS DD, eller eventuelle selv-assosierende deler, analoger eller derivater av noen av disse; og (c) blanding av et hvilket som helst av de TNF-spesfikke fusjonsproduktene av (a) med et hvilket som helst av FAS-R ligand-spesifikke fusjonsproduktene av (b) for å fremskaffe (etter standard seleksjon og renseprosedyrer) oligomere (dimere eller høyere ordens oligomere) reseptorer som har minst begge de ekstracellulære områdene av TNF-R og FAS-R som er forbundet ved hjelp av selv-assosieringsevnen til deres sammensmeltede IC eller DD regioner.

En andre mulighet for fremstilling av de ovenfor nevnte blandede oligomere reseptorene er ved ko-transformering av passende vertceller med de ovenfor nevnte ekspresjonsvektorene, en av hvilke koder for TNF-spesifikke TNF-R fusjonsprodukter og et av hvilke koder for FAS-R ligandspesifikke FAS-R fusjonsprodukter. Etter ekspresjonen av disse forskjellige fusjonsproduktene i vertcellene kan de blandede oligomere (TNF-R/FAS-R) reseptorene bli oppnådd ved hjelp av standard rensing og seleksjonsprosedyrer.

Anvendeligheten til disse blandede affinitetsoligomere reseptorene er primært for nøytralisering av både TNF og FAS-R ligandene når den endoge ekspresjonen er for stor eller er ved uønsket høye nivåer etter eksogen administrasjon. Nylig bevis påpeker en sannsynlighet at det eksisterer en synergisme i funksjon mellom FAS-R liganden (vanligvis celleoverflate-assosiert) og TNF-α (som også kan være celleoverflate-assosisert). Følgelig i noen tilfeller er det ønskelig å nøytralisere begge disse ligandene ved det samme punkt på celleoverflaten, dvs. en slik blandet affinitetsreseptor kan blokkere både TNF bindingen til dets reseptor og bindingen av FAS-R liganden til dets reseptor. Følgelig kan disse blandede affinitetsreseptorene bli benyttet som en aktiv ingrediens i farmasøytiske sammensetninger for behandling av slike tilstander (se ovenfor) hvor både TNF og FAS-R ligandeffektene er uønskede.

Tilsvarende langs linjene nevnt ovenfor angående de oppløselige, oligomere TNF-R og FAS-R og blandede TNF-R/FAS-R oligomerene ifølge oppfinnelsen, er det mulig å produsere oppløselige, oligomere reseptorer for andre reseptorer eller hvilke som helst blandinger derav, spesielt de av eventuelle andre familier av TNF/NGF superfamilien. I dette tilfellet kan en hvilken som helst av de ekstracellulære områdene av de forskjelle reseptorene bli sammensmeltet til de ovenfor nevnte selv-assosierte intracellulære områdene eller deler derav eller et hvilket som helst av de intracellulære områdene av superfamiliens medlemmer som er i stand til selv-assosiering.

Ekspresjon av eventuelle av de rekombinante proteinene ifølge oppfinnelsen som nevnt heri kan bli effektuert i eukaryote celler (for eksempel gjær, insekter eller mammalske celler) ved anvendelse av passende ekspresjonsvektorer. En hvilken som helst fremgangsmåte som er kjent i teknikken kan bli benyttet.

For eksempel blir DNA molekyler som koder for proteinene oppnådd ved en hvilken som helst av metodene satt inn i passende konstruerte ekspresjonsvektorer ved teknikker som er vel kjent i teknikken (se Sambrook et al., 1989). Dobbeltstrenget cDNA blir forbundet til plasmidvektorer ved homopolymere haler eller ved restriksjonslinking som involverer anvendelsen av syntetiske DNA linkere eller buttende ligeringsteknikker. DNA ligaser blir benyttet for å ligere DNA molekylene og uønsket sammenbinding blir inngått ved behandling med alkalisk fosfatase.

For å være i stand til ekspresjon av det ønskede protein må en ekspresjonsvektor omfatte også spesifikke nukleotidsekvenser inneholdende transkripsjonell og translasjonell reguleringsinformasjon bundet til DNA som koder for det ønskede protein på en slik måte at det tillater genekspresjon og produksjon av proteinet. Først for at genet skal bli transkribert, må det foran seg ha en promoter som kan gjenkjennes av RNA polymerase til hvilket polymerasen binder og således initierer transkripsjonsprosessen. Det er forskjellige slike promotere i anvendelse, som arbeider med forskjellige effektiviteter (sterke og svake promotere). De er forskjellige for prokaryote og eukaryote celler.

Promoterene som kan bli benyttet i foreliggende oppfinnelse kan være enten konstitutive, for eksempel int promoteren fra bakteriofag Δ, bla promoteren fra ß-laktamasegenet fra pBR322 og CAT promoteren fra kloramfenikolacetyltransferasegenet fra pPR325 etc. eller indusibel slik som de prokaryote promoterene inkludert hoved høyre og venstre promotere fra bakteriofag Δ

(P_L og P_R), trp, recA, lacZ, lacI, ompF og gal promotere av *E. coli*, eller trp-lac hybridpromoteren osv. (Glick, B.R., (1987). Ved siden av anvendelsen av sterke promotere for å generere store mengder mRNA for å oppnå høye nivåer av genekspresjon i prokaryote celler, er det nødvendig å anvende også ribosomale bindingsseter for å sikre at mRNA blir effektivt translatert. Et eksempel er Shine-Dalgarno sekvensen (SD sekvensen) som passende blir plassert fra initieringskodonet og komplementert til 3'-terminalsekvensen av 16S RNA.

For eukaryote verter kan forskjellige transkripsjonelle og tranlasjonelle regulerende sekvnser bli benyttet, avhengig av naturen av verten. De kan være avledet fra virale kilder, slik som adenovirus, bovint paillomavirus, Simian-virus eller lignende, hvor de regulerende signalene er forbundet med et spesielt gen som har et høyt ekspresjonsnivå. Eksemple er TK promoteren for Herpes virus, SV40 early promoter, gjær gal4 genpromoteren etc. Transkripsjonelle initieringsregulerende signler kan bli valgt som tillater represjon og aktivering slik at ekspresjonen av genene kan bli modulert.

DNA molekylet som omfatter nukleotidsekvensen som koder for fusjonsproduktproteinene blir satt inn i en vektor som har de operativt forbundne transkripsjonelle og translasjonelle regulerende signalene som er i stand til integrering av de ønskede gensekvensene i vertcellen. Cellene som har blitt stabilt transformert ved det innførte DNA kan bli selektert ved også å inkludere en eller flere markører som tillater for seleksjon av vertcellene som inneholder ekspresjonsvektoren. Markøren kan sørge for fototropi til en auksotrop vert, biocidresistans, for eksempel antibiotika, eller tungmetaller, slik som kobber eller lignende. Det selekterbare markørgenet kan enten være bundet direkte til DNA gensekvensen som skal bli uttrykt, eller introdusert i den samme cellen ved ko-transfeksjon. Ytterligere elementer kan også være nødvendig for optimal syntese av termineringssignaler, cDNA ekspresjonsvektorer som omfatter slike elementer inkluderer de beskrevet av Okayama, H. (1983).

I en foretrukket utførelsesform vil det innførte DNA molekylet bli innlemmet i et plasmid eller viral vektor som er i stand til autonom replikasjon i den mottagende vert. Faktorer som er viktige i valg av et bestemt plasmid eller viral vektor omfatter: enkelheten med hvilken mottakscellene som inneholder vektoren kan bli gjenkjent og selektert fra de mottagende cellene som ikke inneholder vektoren; antallet kopier av vektoren som er ønskelig i en bestemt vert; og om det er ønskelig å være i stand til å "flytte" vektoren mellom vertceller av forskjellige arter.

Foretrukne prokaryote vektorer omfatter plasmider slike som er i stand til replikasjon i *E. coli*, for eksempel pBR322, ColE1, pSC101, ACYC 184 etc. (se Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989); Bacillusplasmider slik som pC194, pC221, pT127 etc. (Gryczan, T., (1982)); Streptomyces plasmider inkludert pIJ101 (Kendall, J.K. et al., (1987)); Streptomyces bakeriofager slik som ØC31 (Chater, K.F. et al., i: Sixth International Symposium on Actionomycetals Biology (1986)) og Pseudomonas plasmider (John, J.F. et al., (1986) og Izaki. K. (1978)). Foretrukne eukaryote plasmider omfatter BPV, vaccinia SV40, 2-mikronsirkel osv. eller deres derivater. Slike plasmider er velkjente i teknikken (Botstein, D. et al., (1982); Broach, J.R. i: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance (1981); Broach, J.R., (1982); Bollon, D.P. et al., (1980); Manaiatis, T., i Cell Biolgy: A Comprehensive Treatise, Vol. 3: Gene Expression, (1980); og Sambrook et al., 1989).

Straks vektoren eller DNA sekvensen inneholdende konstruktet(ene) har blitt fremstilt for ekspresjon, kan DNA konstruktet(ene) bli introdusert i en passende vertcelle ved en hvilken som helst av forskjellige passende måter: transformasjon, transfeksjon, konjugasjon, protoplastfusjon, elektroporering, kalsiumfosfatutfelling, direkte mikroinjeksjon osv.

Vertceller som skal benyttes ifølge oppfinnelsen kan enten være prokaryote eller eukaryote. Foretrukne prokaryote verter omfatter bakterier slik som *E. coli*, Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, Salmonella, Serratia etc. Den mest foretrukne prokaryote verten er *E. coli*. Bakterielle verter med spesiell interesse omfatter *E. coli* K12 stamme 294 (ATCC 31446), *E. coli* X1776 (ATCC 31537), *E. coli* W3110 (F^-, lambda$^-$, prototropisk (ATCC 27325), og andre enterobakteria slik som Salmonella typhimurium eller Serratia marcescens og forskjellige Pseudomonas arter. Under slike betingelser vil proteinet ikke bli glykosylert. Den prokaryote verten må være forenelig med replikon og kontrollsekvensene i ekspresjonsplasmidet.

Foretrukne eukaryote verter er mammalske celler, for eksempel humane, ape-, mus- og kinesiske hamsterovarie (CHO) celler da de gir post-translasjonelle modifikasjoner til proteinmolekyler inkludert riktig folding eller glykosilering ved korrekte seter. Også gjærceller kan utføre post-translasjonelle peptidmodifikasjoner inkludert glykosylering. Et antall rekombinante DNA strategier eksisterer som benytter sterke promotersekvenser og et høyt antall kopier av plasmid kan bli benyttet for produksjon av de ønskede proteinene i gjær. Gjær gjenkjenner leader-sekvensene på klonede mammalske genprodukter og utskiller peptider som bærer leader-sekvnser (dvs. pre-peptider).

Etter introduksjon av vektoren blir vertcellene dyrket i et selektivt medium som selekter for vekst på vektorinneholdende celler. Ekspresjon av klonede gensekvenser resulterer i produksjon av de ønskede proteinene.

Rensing av rekombinante proteiner blir utført ved en hvilken som helst av fremgangsmåtene kjent for dette formålet, dvs. en hvilken som helst konvensjonell prosedyre som omfatter ekstrahering, utfelling, kromatografi, elektroforese eller lignende. En ytterligere renseprosedyre som kan bli benyttet ved preferanse for rensing av proteinet ifølge oppfinnelsen er affinitetskromatografi ved anvendelse av anti-TNF reseptor monoklonale antistoffer som blir produsert og immobilisert på en gelmatriks inneholdt i en kolonne. Urene preparater inneholdende det rekombinante proteinet blir ledet over kolonne. Proteinet vil bli bundet til kolonnen ved det spesifikke antistoffet mens urenhetene vil gå gjennom. Etter vasking blir proteinet eluert fra gelen ved en forandring av pH eller ionestyrke.

Som benyttet her (se ovenfor) refererer uttrykket "salter" til både salter av karboksylgrupper og til syreaddisjonssalter av aminogrupper av proteinmolekylet dannet ved midler som er kjent i teknikken. Salter av en karboksylgruppe omfatter uorganiske salter, for eksempel, natrium, kalsium og salter med organiske baser slik som de eksempelvis dannet med aminer, slik som trietanolamin, arginin eller lysin. Syreaddisjonssalter omfatter for eksempel salter med mineralsyrer og salter med organiske syrer.

"Funksjonelle derivater" som benyttet her dekker derivater som kan bli fremstilt fra de funksjonelle gruppene som opptrer som sidekjeder på restene eller de N- eller C-terminale gruppene ved midler som er kjent i teknikken, og blir inkludert i oppfinnelsen så lenge de forblir farmasøytisk akseptable, dvs. de ødelegger ikke aktiviteten til proteinet og gir ikke toksiske egenskaper til sammensetninger inneholdende dem. Disse derivatene omfatter alifatiske estere eller amider av karboksylgruppene og N-acylderivater av frie aminogrupper av O-acylderivater av frie hydroksylgrupper dannet med acylgrupper (for eksempel alkanoyl eller karboksylsyrearoylgrupper). "Fraksjoner" som benyttet her refererer til en hvilken som helst del eller porsjon av reseptoren, (intracellulære eller ekstracellulære områder derav), eller av proteinene som binder til det intracellulære området av reseptoren, forutsatt at den opprettholder dets biologiske aktivitet.

Som nevnt ovenfor angår foreliggende oppfinnelse også forskjellige farmasøytiske sammensetninger omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer og forskjellige noterte aktive ingredienser ifølge oppfinnelsen eller deres salter, funksjonelle derivater eller blandinger av en hvilken som helst av foregående. Disse sammensetningene kan bli benyttet i hvilke som helst av tilstandene som notert her, for eksempel i tilstander hvor der er en overproduksjon av endogent TNF, slik som i tilfeller av septisk sjokk. cachexia, graft-versus vertreaksjoner, autoimmune sykdommer som rheumatoid arthritis osv. Administrasjonsmåten kan være via en hvilken som helst akseptert administrasjonsmåte for tilsvarende midler og vil avhenge av tilstanden som skal behandles, for eksempel når benyttet for å hemme TNF effekter blir de administrert intravenøst i tilfelle av septisk sjokk eller lokal injeksjon i tilfelle av rheumatoid arthritis (for eksempel i kneet), eller kontinuerlig ved infusjon osv. Sammensetningene kan også bli benyttet for eksempel ved tilfeller av TNF intoksikering forårsaket av eksogen administrering av for store mengder (overdoser) av TNF, for eksempel i tilfellet ved cancerterapi eller terapi av virale sykdommer.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen blir fremstilt for administrering ved blanding av proteinet eller dets derivater med fysiologisk akseptable bærere, stabilisatorer og hjelpestoffer, og fremstilt i doseringsform, for eksempel ved lyofilisering i doseringsglass. Mengden aktiv forbindelse for administrering vil avhenge av administrasjonsveien, sykdommen som skal behandles og tilstanden til pasienten. For eksempel vil lokal injisering ved inflammatoriske tilstander ved rheumatoid arthritis kreve mindre aktiv ingrediens på kroppsvektbasis enn intravenøs infusjon ved septisk sjokk.

Andre aspekter av oppfinnelsen vil bli tydelig fra de følgende eksempler. Oppfinnelsen vil nå bli beskrevet i større detalj i de følgende ikke-begrensende eksemplene og de vedlagte figurer:

EKSEMPEL 1

Kloning og isolering av proteiner som binder til de intracellulære områdene av p55 og p75 TNF reseptorene

For å isolere proteiner som vekselvirker med de intracellulære områdene av p55 og p75 TNF reseptorene (p55IC og p75 IC), ble gjær to-hybrid systemet benyttet (Fields og Song, 1989). Kort er dette to-hybrid systemet et gjærbasert genetisk analysesystem for å detektere spesifikke protein-proteininteraksjoner *in vivo* ved gjeninnføring av en

eukaryot transkripsjonell aktivator slik som GAL4 som har to separate områder, et DNA bindende og et aktiveringsområde, hvilke områder når uttrykt og bundet sammen for å danne et gjeninnført GAL4 protein, er i stand til å binde til en oppstrøms aktiveringssekvens som igjen aktiverer en promoter som kontrollerer ekspresjonen av et reportergen slik som lacZ eller HIS3, ekspresjonen av hvilke enkelt blir observert i de dyrkede cellene. I dette systemet blir genene for de aktuelle vekselvirkende proteinene klonet inn i separate ekspresjonsvektorer. I en ekspresjonsvektor blir sekvensen av et aktuelt protein klonet inn i fase med sekvensen av GAL4 DNA-bindende område for å generere et hybrid protein med GAL4 DNA-proteinområdet, og i den andre vektoren blir sekvensen av det andre aktuelle proteinet klonet i fase med sekvensen av GAL4 aktiveringsområdet for å generere et hybridprotein med GAL4-aktiveringsområdet. De to hybridvektorene blir så ko-transformert inn i en gjær vertstamme som har et lacZ eller HIS3 reportergen under kontroll av oppstrøms GAL4 bindingsseter. Kun de transformerte vertcellene (kotransformantene) i hvilke de to hybridproteinene blir uttrykt og er i stand til å vekselvirke med hverandre, vil være i stand til ekspresjon av reportergenet. For lacZ reportergenet vil vertceller som uttrykker dette genet bli blå i farge når X-gal blir tilsatt til kulturene. Således er blå kolonier indikative på det faktum at de to klonede kandidatproteinene er i stand til å vekselvirke med hverandre.
Ved bruk av dette to-hybridsystemet blir de intracellulære områdene p55IC og p75IC klonet separat inn i vektoren pGBT9 (som bærer GAL4 DNA-bindingssekvensen, levert av CLONTECH, USA, se nedenfor), for å danne fusjonsproteiner med det GAL4 DNA-bindende området (tilsvarende, ble det intracellulære området, FAS-IC og en del av 55IC, nemlig 55DD også klonet inn i pGBT9 og benyttet for å isolere andre IC-bindende proteiner, se eksempel 3 nedenfor). For kloning av p55IC og p75IC inn i pGBT9 ble kloner som kodet for full-lengde cDNA sekvenser av p55 TNF-R (Schall et al., 1990) og p75 TNF-R (Smith et al., 1990) benyttet fra hvilke de intracellulære områdene (IC) ble skåret ut som følger: p55IC ble skåret ved anvendelse av enzymene EcoRI og SalI, EcoRI-SalI fragmentet inneholdende p55IC sekvensen ble så isolert ved standard prosedyrer og ført inn i pGBT9 vektoren åpnet ved dets multiple kloningsseteregion (MCS), ved hjelp av EcoRI og SalI. p75 IC ble skåret ut ved hjelp av enzymene BspHI og SalI, BspHI-SalI fragmentet inneholdende p75 IC sekvensen ble isolert ved standard prosedyrer og fylt inn ved hjelp av Klenow enzymet for å generere et fragment som kan bli satt inn i pGBT9 vektoren åpnet med SmaI og SalI.

De ovenfor angitte hybride (chimere) vektorerne ble så kontransfektert (separat, en kotransfeksjon med p55IC hybridet og en med p75 IC hybridvektoren) sammen et cDNA bibliotek fra humane HeLa celler klonet med pGAD GH vektoren, som bærer

GAL4 aktiveringsområdet, inn i HF7c gjærvertstammen (alle de ovenfor angitte vektorene pGBT9 og pGAD GH som bærer HeLa celle cDNA biblioteket og gjærstammen ble fra anskaffet fra Clontech Laboratories, Inc., USA, som en del av MATCHMAKER Two-Hybrid System, #PT1265-I). De ko-transfekterte gjærene ble valgt for deres evne til å vokse i medium uten histidin (His^- medium), dyrking av kolonier som var indikative på positive transformanter. De valgte gjærklonene ble så testet for deres evne til å uttrykke lacZ genet, dvs. for deres LAC Z aktivitet, og dette ved tilsetning av X-gal til kulutmediet som blir katabolisert for å danne et blåfarget produkt ved ß-galoksidase, enzymet kodet ved lacZ genet. Således er blå kolonier indikative for et aktivt lacZ gen. For aktivitet av lacZ genet er det nødvendig at GAL4 transkripsjonsaktivatoren er tilstede i en aktiv form i de transformerte klonene, nemlig at GAL4 DNA-bindende område som koder for en av de ovenfor nevnte hybridvektorene, er kombinert riktig med GAL4 aktivatorområdet som er kodet ved den andre hybridvektoren. En slik kombinasjon er kun mulig dersom de to proteinene sammensmeltet til hver av GAL4 områdene er i stand til stabilt å vekselvirke (bindende) til hverandre. Således ble His^+ og blå (LAC Z^+) kolonier som ble isolert, kolonier som har blitt kotransfektert med en vektor kodende for p55IC og en vektor som koder for et proteinprodukt av human HeLa celleopprinnelse som er i stand til å binde stabilt til p55IC; eller som har blitt transfektert med en vektor som koder for p75IC og en vektor som koder for et proteinprodukt av human HeLa celleopprinnelse som er i stand til å binde stabilt til p75 IC.

Plasmid DNA fra de ovenfor nevnte His^+, LAC Z^+ gjærkoloniene ble isolert og elektroporert inn i E. coli stamme HB101 ved standard prosedyrer ved valgt av Leu^+ og ampicillin resistente transformanter, disse transformantene er de som bærer hybrid GAD GH vektoren som har både de Amp^R og Leu^2 kodende sekvensene. Slike transformanter er derfor kloner som bærer sekvensene som koder for nylig identifiserte proteiner som er i stand til binding til p55IC eller p75IC. Plasmid DNA ble så isolert fra disse transformerte E. coli og retestet ved:

(a) retransformering av dem med de opprinnelig intracellulære område hybridplasmidene (hybrid pGTB9 som bærer enten p55IC eller p75IC sekvensene) inn i gjærstamme HF7 som angitt ovenfor. Som kontroller ble det benyttet vektorer som bærer irrelevante proteinkodende sekvenser, for eksempel pACT-lamin eller pGT9 alene for kotransfeksjon med det p55IC-bindende protein elelr p75IC-bindende protein kodende plasmider. De kotransformerte gjærene ble så testet for vekst på His^- medium alene, eller med forskjellige nivåer av 3-aminotriazol; og

(b) retransformering av plasmid DNA og opprinnelig intracellulære område hybridplasmider og kontrollplasmider beskrevet i (a) inn i gjærceller av stamme SFY526 og bestemmelse v LAC Z^+ aktiviteten (effektivitet på ß-gal dannelse, dvs. blåfargedannelse).

Resultatene av testene ovenfra avslørte at vekstmønsteret til koloniene i His^- mediet var identisk med mønsteret av LAC Z aktivitet; som målt ved fargingen av kolonien, dvs. His^+ koloniene var også LAC Z^+. Dessuten ble LAC Z aktiviteten i væskekultur (foretrukne kulturbetingelser) analysert etter transfeksjon med GAL4 DNA-binding og aktiveringsområde hybrider inn i SFY526 gjærverter som hadde en bedre LAC Z indusibilitet med GAL4 transkripsjonsaktivatoren enn den til HF-7 gjærvertsceller.

Resultatene fra de ko-transfeksjonene ovenfor angitt i tabell 1 nedenfor, fra hvilken det er tydelig at et antall proteiner ble funnet som var i stand til binding til p55IC eller p75IC, nemlig proteinene betegnet 55.11, som binder til p55IC; og 75.3 og 75.16 som binder til p75IC. Alle disse p55IC- og p75IC-bindende proteinene er autentiske humane proteiner som alle er kodet ved cDNA sekvenser som stammer fra HeLa celle cDNA biblioteket som ble sammensmeltet til GAL4 aktiveringsområdesekvensen i plasmidet pGAD GH i det ovenfor nevnte gjær to-hybrid analysesystemet.

Interessant har det også blitt funnet at fragmenter av p55IC selv, nemlig proteinene betegnet 55.1 og 55.3 var i stand til binding til p55IC. Disse er diskutert også i eksempel 2 nedenfor.

TABELL 1

OPPSUMMERING AV KARAKTERISTIKKENE TIL NOEN AV cDNA KLONENE (SE OGSÅ EKSEMPEL 3) ISOLERT VED TO-HYBRID SYSTEMTILNÆRMINGEN

DNA-bindende-område hybrid	Aktiverings-område hybrid	Kolonifarge	Lac Z aktivitet i væskekulturanalyse
pGBT9-IC55	--	hvit	0,00
pGBT9-IC55	55,1	blå	0,65
pGBT9-IC55	55,3	blå	0,04
--	55,1	hvit	0,00
--	55,3	hvit	0,00
pACT-lamin	55,1	hvit	0,00
pACT-lamin	55,3	hvit	0,00
pGBT9	55,1	hvit	0,00
pGBT9	55,3	hvit	0,00
pGBT9-IC55	55,11	blå	ND
--	55,11	hvit	ND
pACT-lamin	55,11	hvit	ND
pGBT9	55,11	hvit	ND
pGBT9-IC75	75,3	blå	ND
pGBT9-IC75	--	hvit	ND
--	75,3	hvit	ND
pACT-lamin	75,3	hvit	ND
pGBT9	75,3	hvit	ND
pGBT9-IC75	75,16	blå	ND
--	75,16	hvit	ND
pACT-lamin	75,16	hvit	ND
pGBT9	75,16	hvit	ND

I tabell 1 ovenfor er plasmidene og hybridene som koder for GAL4 DNA-bindende område og GAL4 aktiverende område som følger:

DNA-bindende områdehybrider:

pGBT9-IC55: full-lengde intracellulært område for p55-TNF-F (p55IC)

pACT-lamin: irrelevant proteinlamin

pGBT9: vektor alene

pGBT9-IC75: full-lengde intracellulært område av p75-TNF-R (p75IC)

Aktiveringsområdehybrid:

55.1 og 55.3 tilsvarer fragmenter av det intracellulære området av p55-TNF-R

55.11: er det nye proteinet forbundet med p55-TNF-R

75.3 og 75.16 er de nye proteinene assosisert med p75-TNF-R
De ovenfor angitte klonede cDNA som koder for nye p55IC- og p75IC-bindende proteinene, 55.11, 75.3 og 75.16, ble så sekvensert ved anvendelse av standard DNA sekvenseringsprosedyrer. De delvise sekvensene til alle disse proteinkodende sekvensene angitt i fig. 1 a-c, hvor fig. 1(a) viser sekvensen av cDNA som koder for protein 55.11; fig. 1(b) angir den delvise sekvensen til cDNA som koder for protein 75.3; og fig. 1(c) angir den delvise sekvensen til cDNA som koder for protein 75.16. I fig. 1(d) er det vist den avledede aminosyresekvensen av protein 55.11, som avledet fra nukleotidsekvensen i fig. 1(a).

Det må imidlertid noteres at en delvis sekvens til cDNA som koder for 55.11 proteinet også har blitt rapportert av Khan et al. (1992) i et studie av humane hjerne cDNA sekvenser, hvis studier var rettet mot etableringen av en hurtig og nøyaktig fremgangsmåte for sekvensering og fysiskalsk og genetisk mapping av human hjerne cDNA. Imidlertid ga Khan et al. ingen informasjon hva angår funksjonen eller andre karakteristikker til proteinet som er kodet ved 55.11 cDNA sekvensen, slike funksjonelle eller andre analyser var ikke hensikten til Khan et al. i deres studie.

Analyse og karakterisering av 55.11 proteinet

(a) Generelle prosedyrer og materialer

(i) Kloning av cDNA av 55.11

Etter analyse (for eksempel Northern analyse, se nedenfor) av cDNA protein 55.11 ble det avslørt at ovenfor angitte 55.11 cDNA klonet ved to-hybrid screen-prosedyren representerte kun et delvis cDNA 5.11 med nukleotidene 925-2863 (se fig. 1(a)) som koder for aminosyrer 309-900 (se fig. 1(d)). Den gjenværende del av 55.11 cDNA [nuklotider 1-924 (fig. 1(a)) som koder for aminosyrer 1-308 (fig. 1(d))] ble oppnådd ved standard prosedyrer, nemlig ved kloning av PCR fra en human fetal lever cDNA bibliotek (for flere detaljer, se nedenfor). Den fulle nukleotidsekvensen av 55.11 (fig. 1(a)) ble bestemt i begge retninger ved dideoksykjede termineringsmetoden.

(ii) To-hybrid ß-galaktosidase ekspresjonstester

ß-galaktosidase ekspresjonstester ble utført som beskrevet ovenfor bortsett fra at i noen av testene ble pVP16 vektoren, som inneholder aktiveringsområdet av VP16, benyttet i stedet for pGAD-GH, Gal4 aktiveringsområdevektoren. Nummereringen av restene i proteinene som er kodet ved cDNA insertene, er som i Swiss-Prot databank.

Delesjonsmutanter ble produsert ved PCR, og punktmutasjoner ved oligonukleotid-rettet mutagenese (Kunkel, 1994).

(iii) Northern-analyse

Totalt RNA ble isolert ved anvendelse av TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Oh., USA) denaturert i formaldehyd/formamidbuffer, elektroforisert gjennom en agarose/formaldehydgel og blottet til en GeneScreen Plus membran (Dupont, Wilmington, De., USA) i 10xSSPE buffer ved bruk av standard teknikker. Hybridiseringsblottene ble hybridisert med det delvise cDNA av 5.11 (se ovenfor, nukleotider 925-2863), radiomerket med random-prime kit (Boehringer Mannheim Biochemia, Mannheim, Tyskland) og vasket grundig. Autoradiografi ble utført i 1 uke.

(iv) Ekspresjon av 55.11 cDNA i HeLa celler og binding av 55.11 proteinet til glutation S-transferase fusjonsproteiner av p55-IC

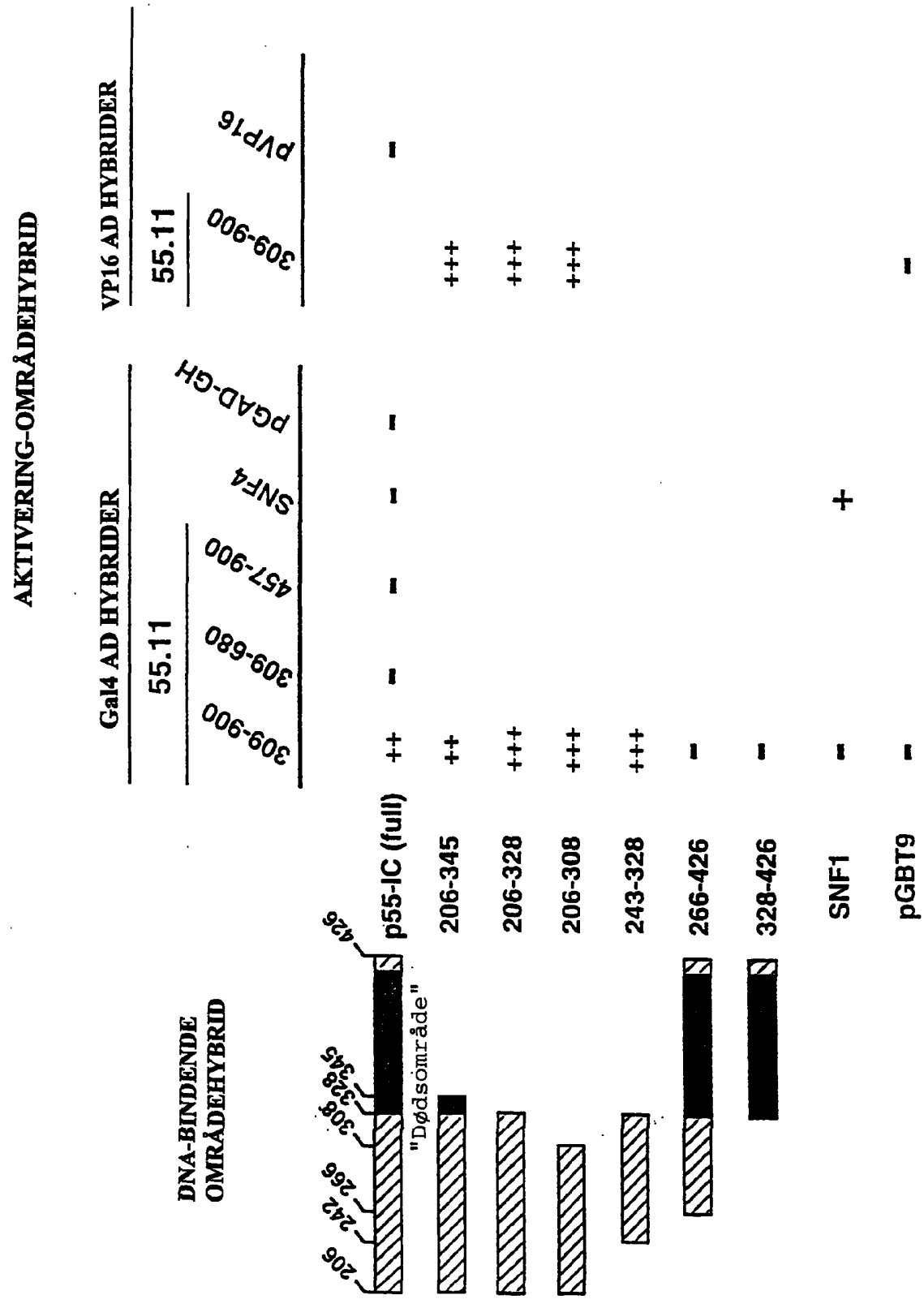
Glutation S-transferase (GST) fusjonerer med p55-IC (GST-p55IC) og med p55-IC trunkerte nedenfor aminosyre 345 (GST-p55IC345) ble produsert og absorbert på glutation-agaroseperler som beskrevet i eksempel 2 nedenfor (se også Smith og Corcaran, 1994; Frangioni og Neel, 1993). cDNA av 55.11 (1-2863 nukleotider, dvs. full-lengde 55.11 cDNA) av FLAG-55.11 og av luciferase ble uttrykt i HeLa celler. FLAG-55.11 er regionen som løper videre mellom restene 309 og 900 i 55.11 proteinet (det delvise cDNA av 55.11 (nukleotider 925-2863), opprinnelig klodet med to hybrid screen), N-forbundet til FLAG oktapeptidet (Eastman Kodak. New Haven, Ct., USA). Ekspresjon av fusjonsproteinene ble gjort ved hjelp av tetracyklin-kontrollert ekspresjonsvektor (HtTA-1) i en HeLa celleklone som uttrykte en tetracyklin-kontrollert transaktivator (se eksempel 2 nedenfor, og Gossen og Bujard, 1992). Metabolisk merking av de uttrykte proteiner med [^{35}S] Met og [^{35}S] Cys (Dupont, Wilmington, De., USA og Amersham, Buckinghamshire, England), lysis av HeLa celler, immunoprecipitering og binding av de merkede proteinene med GST fusjonsproteinene, ble utført som beskrevet nedenfor (eksempel 2), bortsett fra at 0,5% i stedet for 0,1% Nonidet P-40 var tilstede i cellelysisbufferen. Immunoprecipiteringene av 55.11 og FLAG-55.11 ble oppnådd ved anvendelse av kanin antiserum (fortynnet 1:500) mot et GS fusjonsprotein inneholdende regionen av 55.11 som går fra aminosyrer 309 og 900 og et musmonoklonalt antistoff mot FLAG oktapeptidet (M2; Eastman Kodak, 5 μg/ml av cellelysat).

(b) Binding av 55.11 proteinet til p55-IC i transformert gjær

I denne studien ble det søkt å fastslå naturen til bindingen mellom 55.11 og p55IC, spesielt regionene av begge av disse proteinene som involvert i denne bindingen. For formålet ovenfor ble to-hybrid prosedyren fulgt hvor forskjellige full-lengde og delesjonsmutanter av p55IC (se også eksempel 2 nedenfor) i "DNA-bindingsomrpde" konstrukter ble benyttet som "rot" for å binde til "byttet", som var det delvise 55.11 proteinet kodet i konstrukter i hvilke den delvise 55.11 sekvensen (rester 309-900, som opprinnelig isolert) var sammensmeltet til "aktiveringsområdet" i vektorene GAL4AD og VP16AD. Videre ble forskjellige delesjonsmutanter av 55.11 også konstruert og sammensmeltet til "aktiveringsområdet" i GAL4AD vektoren (for eksempel mutanter av 55.11 med kun restene 309-680 og 457-900). Bindingen av de forskjellige "bindingsområde" konstruktene til de forskjellige "aktiveringsområde"-konstruktene ble undersøkt i transfekterte SFY526 gjærceller. Bindingen ble målt ved en to-hybrid ß-galaktosidase ekspresjonsfilteranalyse. De ikke-relevante proteinene SNF1 og SNF4 tjente som positive kontroller for "bindingsområde" og "aktiveringssområde" konstruktene; de tomme Gal4 (pGAD-GH) og VP16 (pVP16) vektorene tjente som negative kontroller for "aktiveringsområde" konstruktene; og den tomme Gal4 (pGBT9) vektoren tjente som en negativ kontroll for "bindingsområde" konstruktene. Resultatene i analysen er angitt i tabell 2 nedenfor hvor symbolene "÷÷÷" og "÷÷" indikerer utviklingen av sterk farge i løpet av 20-60 minutter for start av analysen (positive bindingsresultater); og "-" indikerer ingen utvikling av farge innen 24 timer fra start av analysen (negative resultater). Blanke felt i tabellen indikerer at bindingsanalyse ikke ble testet.

TABELL 2

Binding av 55.11 proteinet til p55-IC
i transformert gjær



Fra resultatene vist i tabell ovenfor kan det bli konkludert at 55.11 binder til p55-IC ved et sete som er forskjellig fra "dødsområde" (restene 328-426) av p55-IC.

55.11 proteinet bundet til en trunkert p55-IC fra hvilket dødsområdet har blitt deletert (konstrukt 206-328 i tabell 2), er mer effektivt enn ikke-trunkert p55-IC. Det binder også til en ytterligere C terminalt trunkert konstrukt (konstrukt 206-308) og til et konstrukt fra hvilket både dødsområdet og en membranproksimal del var deletert (konstrukt 243-328). Imidlertid bandt ikke 55.11 proteinet til et konstrukt som var N-terminalt trunkert ned til aminosyre 266 (tabell 2). Disse funnene indikerer at bindingssetet for 55.11 er lokalisert i regionen som går mellom restene 243 og 308 i p55-IC og at N-terminalen i dette bindingssetet er mellom restene 243 og 266.

Overføring av cDNA for 55.11 fra det opprinnelig klonede "bytte" konstruktet som inneholdte Gal4 aktiveringsområdet, til et byttekonstrukt inneholdende VP16 aktiveringsområdet, reduserte ikke bindingseffektiviteten til 55.11 proteinet tl p55-IC (tabell 2). Således syntes strukturen(e) involvert i denne bindingen å ligge innen 55.11 molekylet og involverte ikke setet for fusjon av 55.11 med aktiveringsområdet.

Imidlertid ble bindingen av 55.11 til p55-IC opphevet ved selv begrensede trunkeringer av 55.11 proteinet ved enten dets C(55.11 konstrukt 309-680) eller N terminus (55.11 konstrukt 457-900), (rest 309 er den første resten i 55.11 proteinet som er kodet ved det delvise cDNA klonet opprinnelig isolert i to-hybrid undersøkelsen).

Den observerte bindingen mellom 55.11 og p55-IC syntes å være spesifikk da 55.11 ikke bandt til andre proteiner, inkludert tre reseptorer av TNF/NGF reseptorfamilien (p75-R, Fas/APO1 og CD40) og andre proteiner slik som lamin og cyklin D (data ikke vist). Det må noteres at av de andre TNF/NGF reseptorproteinene testet, var det også testet deler derav som omfatter deres intracellulære områder: human FAS-R (rester 175-319), CD40 (rester 216-277) og p75-TNF-R (rester 287-461), ingen av hvilke bandt 55.11 (data ikke vist).

(c) Northern-analyse av RNA fra flere cellelinjer ved anvendelse av 55.11 cDNA som en probe og kloning av full-lengde 55.11 cDNA

Cellelinjene undersøkt var HeLa CEM, Jurkat, og HepG2 celler avledet fra humant epitelisk karcinoma, en akutt lymfoblastisk T celleleukemi, en akutt T celle leukemi og en hepaatocellulær karcinoma. 55.11 cDNA opprinnelig isolert (nukleotider 925-2863)

ble benyttet som en probe. Prøver besto av 10 µg RNA/spor. Resultatene av Northern-analysen er vist i fig. 2 som er en reproduksjon av et Northern-blot.

Fra fig. 2 er det således tydelig at Northern-analysen ved bruk av 55.11 cDNA som en probe avslørte i flere cellelinjer et enkelt hybridiseringstranskript på omkring 3 kB, som er større enn cDNA (2 kB) av det opprinnelig isolerte 55.11 cDNA. Ved anvendelse av oligonukleotidprimere som tilsvarer 55.11 sekvensen ble det klonet ved PCR en 5' forlengende sekvens hvis lengde var omkring 1 kB. Summen av lengden av denne 5' forlengede enden med den til det opprinnelig klonede cDNA var omkring lengden på 55.11 transkriptet. 3 kB cDNA som omfattet begge disse delene ble effektivt uttrykt i transfekterte HeLa celler (se nedenfor) for å gi et protein på omkring 84 kDa, noe som antyder at 3 kB cDNA inneholder et translasjonelt startsete.

(d) *In vitro* binding av 55.11 proteinet til GST-fusjonsproteiner inneholdende deler av p55-IC

For å sikre at 55.11 faktisk kan binde til p55-IC og ekskludere involvering av gjærproteiner i denne bindingen, ble *in vitro* interaksjon av GST p55-IC fusjonsproteinene produsert ved bakterie med proteinet kodet av 3 kB 55.11 cNDA (55.11-full) produsert av transfekterte HeLa celler, undersøkt. I denne studien ble cDNA for full-lengde 55.11, FLAG-55.11 (rester 309-900 av 55.11 kodet av det opprinnelige klonede partielle cDNA og sammensmeltet ved N terminalen med FLAG oktapeptidet), og luciferase (kontroll) ble uttrykt i transfekterte HeLa celler og metabolisk merket med [^{35}S] Met og [^{35}S] Cys. De følgende proteinene ble sammensmeltet med GST: full-lengde p55-IC (GST-p55-IC) og p55-IC C-terminalt trunkert opp til aminosyre 345 (GST-p55-IC345) for å fjerne det meste av "dødsområdet" (se tabell 2). GST alene tjente som en kontroll. Lysater av de transfekterte cellene ble immunoprecipitert med antistoffer mot 55.11 proteinet når full-lengde 55.11 proteinet ble benyttet for binding av GST-fusjonsproteiner, eller med antistoffer mot FLAG oktapeptidet når FLAG-55.11 fusjonsproduktet ble benyttet for binding av GST-fusjonsproteinene. Proteinene var analysert ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE: 10% akrylamid) fulgt ved autoradiografi.

I fig. 3A og B er det vist reproduksjoner av autoradiogrammene av de ovenfor nevnte SDS-PAGE gelene, hvor fig. 3A viser bindingen av full-lengde 55.11 proteinet (55.11-full) til de forskjellige GST-fusjonsproteinene; og hvor fig. 3B viser bindingen av Flag-55.11 fusjonsproduktet til de forskjellige GST-fusjonsproteiner. I fig. 3A er det vist i

sporet lengst til høyre et kontroll-immunoprecipitat av lysater fra celler transfektert med kun full-lengde 55.11 og immunoprecipitert med anti-55.11 antistoffer (α55.11 Abs.). I fig. 3B er det vist i sporet lengst til høyre et kontroll-immunoprecipitat av lysater av celler transfektert med kun FLAG-55.11 og immunoprecipitert med anti-FLAG antistoffer (αFLAG Abs.).

Således er det tydelig fra fig. 3A og B at proteinet kodet ved full-lengde 55.11 cDNA kan bli uttrykt i HeLa celler og de binder til fusjonsproteiner som inneholdt det fulle p55-IC (GST-p55IC) eller et trunkert p55-IC som manglet det meste av dødsområdet (GST-p55IC345) (fig. 3A). Full-lengde 55.11 proteinet bandt ikke til GST alene (kontroll). Tilsvarende bandt det HeLa celle uttrykte proteinet kodet ved det initielt klonede partielle cDNA av 55.11 i fusjon med FLAG oktapeptid (FLAG-55.11) *in vitro* til GST-p55IC og GST-p55IC345, men ikke til GST (fig. 3B). Resultatene ovenfor gir derfor også ytterligere bevis (se (b) ovenfor) at 55.11 binder til en region av p55IC oppstrøms for "dødsområdet", dvs. regionen av p55-IC som er mer proksimalt for det transmembrane området.

Dessuten demonstrerte studiene ovenfor at antistoffer til 55.11 hadde blitt suksessfullt produsert (fig. 3A).

(e) Sammenligning av den avledede aminosyresekvensen av humant 55.11 til de til relaterte proteiner tilstede i lavere organismer, og sekvensegenskapene til 55.11 proteinet

Som nevnt ovenfor, ifølge foreliggende oppfinnelse, har full-lengde 55.11 cDNA blitt klonet og sekvensert (se nukleotidsekvensen i fig. 1(a)) og full-lengde aminosyresekvensen av 55.11 har blitt avledet fra cDNA sekvensen (se aminosyresekvnsen i fig. 1(d)). Databank (Genbank™/EMBL Databank) søk avslørte at deler av sekvensen av humant 55.11 cDNA (aksessjonnumre T03659, Z19559 og F09128) og dets mushomolog (aksessjonsnumre X80422 og Z31147) allerede har blitt bestemt under tilfeldig sekvensering av cDNA biblioteker. En cDNA sekvens (aksessjonsnummer U18247) som koder for et humant protein på 596 aminosyrer som er tilstede i kulturer av humane hepatoma HC10 celler, er tilsvarende det til 55.11. Dette hepatomaproteinet mangler imidlertid en N terminal del (aminosyrer 1-297) tilsvarende til den til 55.11 og skiller seg også fra 55.11 ved regionene som tilsvarer til restene 297-377 og restene 648-668 i 55.11. Søkene i databanken avslørte også at proteiner med meget høy sekvenshomologi med 55.11 eksisterer i *Saccharomyces cerevisiae* (gjær),

Arabidopsis thaliana (planter) og *Caenorhabditis elegans* (ormer). Således synes 55.11 å oppfylle en evolusjonsmessig konservert funksjon. I gjær er det to kjente proteiner (den åpne leserammen YHR027c og SEN3) hvis DNA sekvenser tilsvarer den til 55.11. Størrelsene av begge er mer den til 55.11. YHR027c er kjent kun ved sekvensering av en genomisk klone, mens SEN3 har blitt klonet som et cDNA. Setene innen 55.11 som er tilsvarende til de i SEN3 korrelerer til setene for dets likhet til YHR027c, selv om mye mer likhet er tydelig mellom 55.11 og YHR027c enn mellom 55.11 og SEN3. DNA sekvensinformasjon som er tilgjengelig for *Arabidopsis thaliana* og *Caenorhabditis elegans* proteinene viser klart, selv om de kun er delvise, at disse proteinene er tilsvarende til 55.11 samt YHR027c proteinet fra gjær. Det eneste av disse fire proteinene hvis natur har blitt utledet hittil er gjær SEN3 hvis homologi til 55.11 er begrenst. SEN3 har blitt identifisert som gjærekvivalenten til p112 subenheten av en aktivator av 20S proteasomet (den proteolytiske kjernen av 26S proteasomet [Rechsteine et al., 1993, DeMartino et al., 1994] (M.R. Culbertson og M. Hockstrasser, personlig overlevering).

I fig. 4 er det vist skjematisk en sammenligning av den avledede aminosyresekvensen av humant 55.11 med den til de ovenfor nevnte, relaterte proteinene som er tilstede i lavere organismer. I fig. 4 er sekvensene sammenlignet med sekvensene av aminosyrer avledet for: 55.11 cDNA (se fig. 1(d)), en åpen leseramme (YHR027c) innen et kosmid avledet fra det 8. kromosom av *Saccharomyces cerevisiae* (nukleotider 21253-24234, aksessjonsnummer U10399); SEN3, cDNA av et *Saccharomyces cerevisiae* protein (aksessjonsnummer L06321); et delvist cDNA av et protein av planten *Arabidopsis thaliana* (aksessjonsnummer T21500), og et delvis cDNA av et protein fra nematoden *Caenorhabditis elegans* (aksessjonsnummer D27396), "KEKE" sekvensen i 55.11 er merket med en heltrukken linje og sekvensen AYAGS(x)$_8$LL med brutte linjer. Sekvensene ble innrettet ved bruk av PILEUP og PRETTYBOX programmene av GCG pakken. Gap introdusert for å maksimalisere innretningene er angitt ved prikker.

Hva angår de forskjellige sekvensegenskapene eller motivene tilstede i den humane 55.11 sekvensen har det følgende blitt observert: Konserverte aminosyresekvensmotiver ble ikke sett i proteinet kodet for av 55.11, bortsett fra en repetitiv "KEKE" sekvens som finnes mellom Lys 614 og Glu 632 (understreket i fig. 4). Slike "KEKE" sekvenser, som er tilstede i mange proteiner, omfatter proteasonale subenheter og kaperoniner, kan fremme assosiasjon av proteinkomplekser (Realini et al., 1994). En sekvens AYAGS(x)$_8$LL synes to ganger i 55.11 proteinet (ved seter 479, 590, se fig. 4); ingen funksjonell signifikans for denne sekvensen har enda blitt beskrevet.

(f) sekvensegenskaper til p55IC regionen involvert i proteinbinding av 55.11

Som beskrevet ovenfor (se (b) og (d)) binder 55.11 proteinet til en region av p55-IC mellom restene 243 og 308 (N terminalen for dette bindingssetet er mellom restene 243 og 266), denne regionen er oppstrøms for "dødsområdet" og mer proksimalt for det transmembrane området av p55-TNF-R. Denne regionen innen p55-IC til hvilken 55.11 binder, har et høyt innhold at prolin, serin og treoninrester. Imidlertid inneholder denne regionen ikke RPM1 og RPM2 prolinrike motiver som er tilstede i flere andre cytokine reseptorer (O'Neal og Y-Lee, 1993). I regionen som løper mellom restene 243 og 266, hvis delesjon ødelegger bindingen av p55-R til 55.11 (se (b) og (d) ovenfor og tabell 2), blir to av serinene og to av treoninen fulgt av prolinrester som gjør dem til potentielle seter for fosforylering ved MAP kinase, CDS2 og andre prolinavhengige kinaser (Seger og Krebs, 1995). Fosforylering av dette setet i reseptoren kan påvirke dets binding til 55.11 proteinet.

I lys av alt ovenfor nevnte med hensyn til protein 55.11 og dets binding til p55-IC, kan det bli konkludert at ifølge foreliggende oppfinnelse har det blitt funnet et nytt protein som binder til en distinkt region oppstrøms for "dødsområdet" av p55-IC. Slik binding kan påvirke TNF-medierte aktiviteter forskjellig fra induksjonen av celledød. Regionen til hvilken 55.11 binder har tidligere blitt vist å være involvert i induksjonen av nitrogenoksydsyntase (Tartaglia et al., 1993) og synes å være involvert i aktiveringen av nøytrl spingomeylinase ved TNF (Wiegmann et al., 1994). Det er således mulig at assosiering (binding) av 55.11 med det intracellulære området av p55-TNF-R (p55IC) påvirker eller er involvert i: (i) signaleringen for disse ovenfor angitte eller andre TNF effekter, (ii) foldingen eller prosessering av protinet (som foreslått ved likheten av 5.11 med en subenhet av 26S protesomet), eller (iii) reguleringen av aktiviteten eller ekspresjon av p55-TNF-R.

EKSEMPEL 2

Selv-assosieringsevne til det ekstracellulære området av p55 TNF reseptoren (p55IC) og dets evne til å forårsake celledød og andre egenskaper og aktiviteter derav, og et relatert Fas/APO1 reseptor intracellulært område

Som angitt i eksempel 1 ovenfor, ble det oppdaget at det intracellulære området av p55 TNF-R (p55IC) er i stand til binding til seg selv, og videre at fragmenter av p55IC, nemlig proteinene 55.1 og 55.3, også er i stand til binding til p55IC.

Det har blitt vist at bindingen av TNF til p55 TNF-R fører til en cytocidal effekt på cellene som bærer denne reseptoren. Videre kan antistoffer mot det ekstracellulære området av denne reseptoren selv utløse effekten i korrelasjon med effektiviteten til reseptortverrbindingen ved dem.

I tillegg viste mutasjonsstudier (Tartaglia et al., (1993); Brakebusch et al., (1992)) at funksjonen til p55-R avhenger av integriteten av dets intracellulære område. Det ble derfor foreslått at initieringen av signaleringen for den cytocidale effekten av TNF opptrer som en konsekvens av assosiasjon av to eller flere intracellulære områder av p55-R (p55-IC), pålagt ved reseptoraggregering. Resultatene ifølge foreliggende oppfinnelse fremskaffer ytterligere bevis for dette ved å vise at ekspresjonen av det intrcellulære området av p55-R i cellene uten det transmembrane eller intracellulære området, utløser deres død. Slike frie intracellulære områder av p55-R er vist å selv-assosiere, som sannsynligvis står for deres evne til å fungere uavhengig av TNF. Det faktum at signaleingen av full-lengde p55-R er avhengig av TNF stimulering, er foreslått å reflektere aktiviteter til transmembrant eller ekstracellulært område av reseptoren som reduserer eller hindrer dets selv-assosiering.

Evnen til det intracellulære området av p55-R (p55-IC) til selv-assosiering ble funnet å være heldig i forsøkene på å klone effektorproteinene som vekselvirker med denne reseptoren (se eksempel 1 ovenfor). Det ble for dette formålet benyttet den ovenfor nevnte "to hybrid" teknikken. I tillegg til det nye proteinet 55.11 funnet å assosiere (binde) til p55IC, ble det funnet at tre andre klonede HeLa celle cDNA inneholdt cDNA sekvenser som kodet for deler av det intracellulære området av p55-R, noe som betyr at p55-IC er i stand til selv-assosiering. To av disse klonene var identiske, inneholdende et insert som kodet for aminosyrene 328-426 (angitt som klone 55.1 som kodet for proteinfragment 55.1 av p55IC). Den tredje inneholdt et lenger insert som kodet for aminosyrer 277-426 (betegnet som klone 55.3 som kodet for proteinfragment 55.3 på p55IC).

I tillegg ble <u>in vitro</u> interaksjon mellom to bakterielt produserte chimeras av p55IC, en i hvilken det var fusert til maltosebindingsproteinet (MBP) og den andre i hvilken det var fusert til glutation-S-transferase (GST). Disse chimeras ble konstruert, klonet og uttrykt ved standard metoder. Etter deres ekspresjon ble det undersøkt selvinteraksjonen av p55-R intracellulært område (p55IC) ved bestemmelse av interaksjonen av de ovenfor bakterielt produserte chimere proteinene GST-IC55 (Mr - 51kD) og MBP-IC55 (Mr -

67 kD) med hverandre. Like mengder GST-IC55 chimera (prøver fra spor 1-4 i fig. 5) eller GST alene (prøver fra spor 5-8 i fig. 5) ble bundet til glutationagaroseperler (Sigma) og så inkubert med den samme mengden MBP-IC55 fusjonsprotein i en av de følgende bufferoppløsningene:

(i) buffer I (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0,2% Triton X100, 0,5 mM PMSF, 5% glycerol). Dette ble gjort for prøvene i spor 1 og 5 i fig. 5.

(ii) buffer I inneholdende 5mM EDTA i stedet for $MgCl_2$. Denne ble gjort for prøvene i spor 2 og 6 i fig. 5.

(iii) buffer I inneholdende 250 mM i stedet for 100 mM KCl. Dette ble gjort for prøvene i spor 3 og 7 i fig. 5.

(iv) buffer I inneholdende 400 mM i stedet for 100 mM KCl. Dette ble gjort for prøvene i spor 4 og 8 i fig. 5.

Etter inkubering med rotasjon i 2 timer ved 4°C ble perlene vasket med de samme bufrne og så kokt i SDS-PAGE bufferen fulgt av elektroforese ved PAGE. Proteinene på gelen ble så Western-blottet på nitrocellulosemembranen som så ble farget med polyklonalt antiserum mot MBP. En reproduksjon av disse fargede Western-blot er vist i fig. 5, prøvene i spor 1-8 er de angitt ovenfor.

Fra fig. 5 er det tydelig at p55IC-MBP chimera binder til p55IC-GST chimera (spor 1-4) uavhengig av divalente kationer og selv ved en relativt høy saltkonsentrasjon (0,4M KCl). Således ble det konkludert at p55IC er i stand til å selv-assosiere kraftig.

For å evaluere de funksjonelle implikasjonene av tendensen til p55-IC å selv-assosiere, ble det forsøkt å uttrykke p55-IC i cytoplasmaet av celler som er sensitive for den cytocidale effekten av TNF. Med hensyn på muligheten at p55-IC vil være cytotoksisk, ble det valgt å uttrykke den på en induserbar måte ved anvendelsen av det nylig utviklede, sterkt regulerte tetracyklinkontrollerte mammalske ekspresjonssystemet (Gossen og Boujard, 1992). Ekspresjon av p55-IC resulterte i massiv celledød (fig. 6, høyre panel). De døende cellene viste oppløsning av celleoverflaten som observert ved avliving av celler ved TNF. Transfeksjon av p55-IC konstruktet til cellene i nærvær av tetracyklin som ifølge rapporter reduserte ekspresjonen av pHD10-3 regulerte

konstruker så mye som 10^5 fold, resulterte fremdeles i noe celledød, selv om den var signifikant mindre enn den observert i fravær av tetracyklin (fig. 6, venstre panel). I kontrast viste celler transfektert med et kontrollkonstrukt inneholdende luciferase cDNA, ingen tegn på celledød (resultater ikke vist).

Evnen til p55-IC til å utløse celledød når uttrykt uten transmembrane eller ekstacellulære områder på reseptoren, ga ytterligere bevis for involveringen av dette området i signalering. Videre indikerer det at det ikke er noen andre deler av reseptoren som spiller en direkte rolle i slik signalering. Studier av effektene av mutasjoner, inkludert de mutasjoner studert i foreliggende oppfinnelse, på funksjonen av p55-IC, indikerte at regionen som løper mellom aminosyrerestene 326 og 407 er meget kritisk for dets funksjon. Denne regionen viser en markert likhet med sekvensen i det intracellulære området av de to andre reseptorene, som er evolusjonsmessig relatert til p55 TNF-R, nemlig Fas reseptoren (Itoh et al., 1991); Oehm et al., 1992) som også kan signalere for celledød og CD40, en reseptor (Stamenkovic et al., 1989) som øker cellevekst; denne sekvensen synes derfor å utgjøre et konserveringsmotiv som spiller en slags generell rolle ved signalering. Da den ikke ligner kjente motivkarakteristikker for enzymatiske aktiviteter, synes det plausibelt at den signalerer på en indirekte måte, dvs. muligens ved å tjene som et dokkingsete for signaleringsenzymer eller for proteiner som overfører stimulerende signaler til dem. p55-IC, Fas reseptoren og CD 40 kan alle bli stimulert ved antistoffer mot deres ekstracellulære området. Deres stimulering kan bli vist å korrelere med evnen til antistoffer til å tverrbinde reseptoen. Det synes derfor som om signaliseringen blir initiert som en konsekvens av interaksjon av to eller flere intracellulære områder ved hjelp av aggregering av de ektracellulære områdene. Involvering av slik interaksjon i initieringen av signalering av disse reseptorene ble også indikert ved studier (Brakebusch et al., 1992) som viser at ekspresjonen av reseptorer som er gjort ikke-funksjonelle ved mutasjon av deres intracellulære område, hadde en "dominant negativ" effekt på funksjonen av ko-uttrykte normalreseptorer. Aggregering av p55-R som respons på TNF ble antydet å skje på en passiv måte, kun på grunn av det faktum at hver av TNF molekylene som opptrer som homotrimerer, kan binde to eller tre reseptormolekyler. Imidlertid antyder funnene i foreliggende oppfinnelse at denne prosessen opptrer noe annerledes.

Tendensen til p55-IC til selv-assosiering indikerer at dette området spiller en aktiv rolle i dets induserte aggregering. Dessuten synes aktiviteten til p55-IC å være tilstrekkelig for initiering av dets signalering, da den når den blir uttrykt uavhengig av resten av reseptormolekylet, kan utløse celledød i fravær av TNF eller en hvilken som helst annen

ytre stimuli. Likevel, når uttrykt som full-lengde reseptoren, signaliserer p55-TNF-R ikke, hvis den ikke blir stimulert av TNF. Man må derfor anta at ved aktivering av p55-TNF-R, overvinner faktisk TNF noen inhibitoriske effekter som forhindrer spontan assosiering av de intracellulære områdene og denne hemmingen skjer på grunn av bindingen av p55-IC til resten av reseptormolekylet. Hemmingen kan skyldes orienteringen som er gitt ved det intracellulære området ved det transmembrane eller ekstracellulære området, for å assosiere noen andre proteiner med reseptoren eller kanskje er årsak til begrensning av mengdene reseptorer som kan være tilstede på plasmamembranen. Denne kontrollmekanismen må naturligvis være meget effektiv, da ifølge noen beregninger bindingen av kun et TNF molekyl til en celle er tilstrekkelig for utløsning av dens død.

Spontan signalering uavhengig av ligand kan resultere i stor forvirring i prosessen kontrollert av reseptoren. Det best kjente eksempel er dereguleringen av vekstfaktorreseptorene. Mutasjoner som er årsak til at de starter signalering spontant, for eksempel de som forårsaker dem aggregerer spontant, spiller en viktig rolle i den deregulerte veksten av tumorceller. TNF effekter, når indusert i overskudd, er velkjent å bidra i patologien i mange sykdommer. Muligheten til frie intracllulære områder (p55IC) av p55-TNF-R å signalisere uavhengig av TNF, kan bidra til slik eksessiv funksjon. Det synes mulig, for eksempel, at noen av de cytopatiske effektene av virus og andre patogener resulterer, ikke fra deres direkte cytocidale funksjon, men fra proteolytisk løsning av det intracellulære området av p55-TNF-R, og den resulterende TNF-lignende cytotoksiske effekten.

For videre å utlede regionene i p55IC som er ansvarlig for dets selv-assosierende evne og således dets liganduavhengige celletoksisitet, og også å bestemme om andre beslektede medlemmer av TNF/NGF reseptorfamilien (for eksempel FAS-R) også har intracellulære områder med selv-assosierende evner og liganduavhengige effekter, ble den følgende detaljerte studien utført:

(a) Generelle prosedyrer og materialer

(i) To-hybrid undersøkelse og to-hybrid ß-galaktosidase-ekspresjonstest

cDNA inserter, som kodet for p55-IC og dets delesjonsmutanter, Fas-IC og forskjellige andre proteiner (se tabell 3), ble klonet ved PCR, enten fra full-lengde cDNA klonet på tidligere i søkers laboratorium, eller fra anskaffede cDNA biblioteker. ß-galaktosidase-ekspresjon i gjær (SFY526 reporterstamme (Bartel et al., 1993)) transformert med disse

cDNA i pGBT-9 og pGAD-GH vektorer (DNA bindende område (DBD) og aktiveringsområde (AD) konstrukter, henholdsvis) ble undersøkt ved en væsketest (Guarente, 1983); det ble også undersøkt ved en filteranalyse for å gi kvantitativt de samme resultater (ikke vist). To-hybrid undersøkelsen (Fields og Song, 1989) av et anskaffet Gal4 AD-merket HeLa celler cDNA bibliotek (Clontech, Palo Alto, Ca., USA) for proteiner som binder til det intracellulære området av p55-R (p55-IC), ble utført ved anvendelse av *HF7c* gjærreporterstamme ifølge anbefalingen fra produsenten. Positive resultater for isolerte kloner ble undersøkt ved (a) prototrofi av transformert gjær for histidin når dyrket i nærvær av 5 mM 3-aminotriazol, (b) ß-galaktosidase-ekspresjon, (c) spesifikke tester (interaksjon med SNF4 og lamin sammensmeltet til Gal4 DBD).

(ii) *In vitro* selv-assosiering av bakterielt produserte p55-IC fusjonsproteiner

Glutation S-transferase (GST) og glutation S-transferase-p55-IC fusjonsprotein (GST-p55-IC) ble produsert som beskrevet andre steder (Frangioni og Neel, 1993; Ausubel et al., 1994). Maltosebindende protein (MBP) fusjonsproteiner ble oppnådd ved anvendelse av pMalcRI vektor (New England Biolabs) og renset på en amyloseresinkolonne. Interaksjonen av MBPP og GST fusjonsproteiner ble undersøkt ved inkubering av glutation-agaroseperler sekvensielt med GST og MBPP fusjonsproteiner (5 µg protein/20 µl perler; først inkubering i 15 minutter, og den andre i 2 timer, begge ved 4°C). Inkubering med MBP fusjonsproteiner ble utført i en bufferoppløsning inneholdende 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiotreitol, 0,2% Triton X100, 0,5 mM fenyl-metyl-sulfonyl-fluorid og 5% (v/v) glycerol, eller når angitt, i den samme buffer inneholdende 0,4 M KCl, eller 5 mM EDTA i stedet for $MgCl_2$. Assosiering av MBP fusjonsproteiner ble undersøkt ved SDS polyakrylamid gelelektroforese (10% akrylamid) av de proteinene som var assosiert med glutation-agaroseperler, fulgt av Western-blotting. Blotene ble testet med kaninantiserum mot MBP (produsert i søkers laboratorium) og med pepperot-peroksidasebundet geit-anti-kanin immunoglobulin.

(iii) Indusert ekspresjon i HeLa celler av p55-R og fragmenter derav

HeLa celler som uttrykte den tetracyklinkontrollerte transaktivatoren utviklet av Gossen og Bujard (HtTA-1 klon (Gossen og Bujard, 1992)), ble dyrket i Bulbeccos modifiserte Eagle's medium inneholdende 10% føtalt kalveserum, 100 µ/ml penicillin, 100 µg/mnl streptomycin og 0,5 mg/ml neomycin. cDNA inserter som kodet for p55-R eller deler derav, ble introdusert i en tetracyklinkontrollerte ekspresjonsvektoren (pUHD 10-3, som

var levert av H. Bujard). Cellene ble transformert med ekspresjonskonstruktet (5 µg DNA/6 cm plate) med kalsiumfosfat precipiteringsmetoden (Ausubel et al., 1994). Effekter av transientekspresjon av transfekterte proteiner ble undersøkt ved de angitte tidene etter transfeksjon i nærvær eller fravær av tetracyklin (1 µg/ml). Kloner av celler som stabilt var transfektert med det humane p55-IC cDNA i pUHD 10-3 vektoren ble stabilisert ved transfektering av cDNA til HtTA-1 celler i nærvær av tetracykliln sammen med et plasmid som ga resistens til hygromycin, fulgt av seleksjon for kloner som var resistente for hygromycin (200 µg/ml). Ekspresjon av cDNA ble oppnådd ved fjerning av tetracyklin som ellers ble opprettholdt konstant i cellevekstmediet.

(iv) Måling av TNF-lignende effekter, utløsning av indusert ekspresjon på p55-R og fragmenter derav

Effekter av indusert ekspresjon på reseptoren og TNF på cellelevedyktighet ble undersøkt ved nøytral-rød opptaksmetoden (Wallach, 1984). Induksjon av IL-8 genekspresjon ble undersøkt ved Northern-analyse. RNA ble isolert ved anvendelse av TRI REAGENT (Molecular Research Center, Inc.), denaturert i formaldehyd/formamidbuffer, elektroforisert gjennom en agarose/formaldehydgel og blottet på en GeneScreen Plus membran (Du Pont) i 10xSSPE buffer ved bruk av standard teknikker. Filtre ble hybridisert med en IL-8 cDNA probe (Matsushima et al., 1988), nukleotider 1-392), radiomerket ved random-prime kit (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Tyskland) og vasket stringent ifølge protokollen til produsenten. Autoradiografi ble utført i 1-2 dager.

(v) Undersøkelse av TNF reseptorekspresjon

TNF reseptorekspresjon i prøver av $1x10^6$ celler ble undersøkt ved måling av binding av TNF, merket med ^{125}I ved kloramin-T metoden, som tidligere beskrevet (Holtmann og Wallach, 1987). Det ble også undersøkt ved ELISA, utført som beskrevet for kvantifiseringen av oppløselige TNF reseptorer (Aderka et al., 1991) bortsett fra anvendelsen av RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoksycholat, 0,1% SDS og 1 mM EDTA) for å lyser cellene (70 µl/10^6 celler) og for å fortynne testprøvene. Den oppløselige formen av p55-R, renset fra urin, tjente som standard.

(b) Mutasjonsanalyse av det intracellulære området av p55-R (p55-IC) for å bestemme regionene av p55-IC som er involvert i dets selv-assosiering

Som angitt ovenfor kan p55-IC selv-assosiere og utløse cytotoksiske effekter på cellene, og der er deler av p55-IC som i seg selv er i stand til å binde til full-lengde p55-IC. Spesielt ble en av delene av p55-IC (betegnet som proteinfragment 55.1 i eksempel 1 ovenfor) identifisert som var i stand til sterk binding til full-lengde p55-IC, denne delen ble sekvensert og ble observert å inneholde aminosyrerestene 328-426 av p55-TNF-R, som er innen p55-IC. Det ble videre oppdaget (se nedenfor) at delen ovenfor, proteinfragment 55.1, er i seg selv stand til selv-assosiering og av utløsning av cytotoksiske effekter på celler. Således er denne delen av p55-IC blitt kalt "dødsområdet" og er lokalisert i regionen mellom aminosyrerestene 328-426 i det humane p55-R, mest sannsynlig bestående av aminosyrerestene mellom omkring rest 328 og 414 derav.

Det faktum at "dødsområdet" av p55-IC selv-assosierer, ble funnet ved et lykketreff. Ved undersøkelse av et HeLa celle cDNA bibliotek ved to-hybrid teknikken (se eksempel 1 ovenfo) for proteiner som binder til det intracellulære området av denne reseptoren, ble det blant cDNA hvis produkter bandt spesifikt til det intracellulære området GAL4 DBD fusjonsprotein, funnet flere kloner (for eksempel 55.1 og 55.3) som i seg selv koder for deler av p55-R intracellulære området (p55-IC, merket med stjerne i tabell 3).

Anvendelsen av to-hybrid testen for å evaluere graden av spesifisitet i selv-assosieringen av p55-IC og for å definere mer nøyaktig den involverte regionen, førte til de følgende funn (tabell 3): (a) Selv-assosieringen av p55-IC er gitt til en region innen "dødsområdet". Dets N terminal er lokalisert mellom restene 328 og 344 og dets C terminal er nær rest 404, noe oppstrøms for den rapporterte C terminalen til dette området (rest 414). (b) Delesjon av den membranproksimale del av p55-IC oppstrøms for "dødsområdet" øket selv-assosieringen, noe som antyder at denne regionen har en hemmende effekt på assosieringen. (c) Mus p55-IC selv-assosiserer, og assosierer også med "dødsområdet" av human p55-R. (d) Undersøkelse av selv-assosieringen av de intracellulære områdene av de tre andre reseptorene av TNF/NGF reseptorfamilien: Fas/APO1 (FAS-R), CD40 (Fields og Song, 1989) og p75 TNF reseptor (Smith et al., 1990), viste at Fas-IC som signaliserer for celledød ved et sekvensmotiv relatert til p55-R "dødsområdet, selv-assosierer, og assosierer til en viss grad med p55-IC. Imidlertid, CD40-IC som gir vekststimulerende signaler (selv om det også inneholder en sekvens

som tilsvarer "dødsområdet") og p75-IC som ikke har noen strukturell likhet med p55-IC, selv-assosierer ikke og binder heller ikke til p55-IC eller Fas-IC.

TABELL 3: Selv-assosiering av de intracellulære områdene av p55-R og Fas/APO1 i transformert gjær: måling ved en to-hybrid β-galaktosidase-ekspresjonstest

HUMAN p55-IC & DELESJONS-MUTANTER	206-426	278-426*	328-426*	328-414	328-404	328-373	344-414	206-326	ANDRE PROTEINER: mus p55-IC	mus Fas-IC	human CD40-IC	human p75-IC	SNF4	pGAD-GH
206-426 / (p55-IC)	5.0	3.6	44.5	30.3	3.5	0	0	0	—	—	—	—	—	0
328-426*	5.2	—	63.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
367-426	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
206-345	0	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
206-326	0	—	0	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
mus p55-IC	0.17	0.38	3.0	—	—	—	—	—	2.5	—	—	—	—	0
mus Fas-IC	0	0	0.14	—	—	—	—	—	0	38.8	—	0	0	0
hu CD40-IC	0	0	0	—	—	—	—	—	0	0	0	—	—	0
human p75-IC	0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	0
SNF1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	0
Lamin	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	0
pGBT9	0	0	0	—	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—

Tabell 3 ovenfor viser at den kvantitative bedømmelsen av interaksjonen av Gal4 hybridkonstruktene omfatter de følgende proteinene: det intracellulære området av human p55-R og dets forskjellige delesjonsmutanter (restene nummerert i (Loetscher et al., 1990)); de intracellulære områdene av mus p55-R (restene 334-454, nummert som i (Goodwin et al., 1991)); mus Fas/APO1 (Fas-IC, 166-306, nummerert som i (Watanabe-Fukanaga et al., 1992)); human CD40 (CD40-IC, 216-277, nummerert som i (Stamenkovic et al., 1989)); og human p75 TNF reseptor (p75-IC, 287-461, nummerert som i (Smith et al., 1990)). SNF1 og SNF4 ble benyttet som positive kontroller for assosiering (Fields og Song, 1989), og lamin som en negativ kontroll (Bartel et al., 1993). Proteiner kodet ved Gal4 DBD konstruktene (pGPT9) er opplistet vertikalt; de kodet ved Gal4 AD konstrukter (pGAD-GH) horisontalt. De to delesjonmutantene angitt ved stjerne ble klonet i en to-hybrid screen av et HeLa celle cDNA bibliotek (Clontech, Palo Alto, Ca., USA) ved anvendelse av p55-IC klonet i pGBT9 som "åte". I den screenen ble fire av de $4x10^6$ undersøkte cDNA klonene positive. Tre av disse klonene ble funnet å korrespondere til deler av humant p55-R cDNA (to var identiske, kodende for restene 328-426 og en kodet for restene 277-426). Den fjerde ble funnet å kode et ukjent protein. ß-galaktosidaseekspresjonsdataene er gjennomsnitt av analyser av to uavhengige transformanter og er presentert som mengde ß-galaktosidaseprodukt; (en aktivitetsenhet er definert som OD_{420} ganger 10^3 dividert på OD_{600} av gjærkulturen og reaksjonstid i minutter). Deteksjonsgrensen for analysen var 0,05 enheter. Variasjon mellom duplikate prøver var i alle tilfeller mindre enn 25% av gjennomsnittet (ikke testet).

En *in vitro* test av interaksjonen av et p55-IC-glutation-S-transferase (GST) bakterielt fusjonsprotein med et p55-IC-maltosebindende protein (MBP) fusjonsprotein bekreftet at p55-R selv-assosierte og utelukket involvering av gjærproteiner i denne assosiasjonen (se ovenfor). Assosiasjonen ble ikke påvirket ved øket saltkonsentrasjon eller ved EDTA (se ovenfor).

For å evaluere funksjonelle implikasjoner av selv-assosiering av dødsområdet, ble det undersøkt måten på hvilken indusert ekspresjon av p55-R eller deler derav, påvirket celler sensitive for TNF cytotoksisitet. Resultatene av denne analysen er angitt i fig. 7 som angir den liganduavhengige utløsningen av en cytocidal effekt i HeLa celler transfektert med p55-R, dets intracellulære område (p55-IC) eller deler derav (inkludert "dødsområdet").

I fig. 7 er det skjematisk vist de forskjellige DNA molekylene som koder for de forskjellige typene TNF reseptorer inkludert i vektorene med hvilke HeLa celler ble transfektert (helt til venstre i fig. 7); og ekspresjonen (venstre og midtre kurver) og levedyktigheten (kurven til høyre) i HeLa celler som transientuttrykker de forskjellige full-lengde p55-R (p55-R), p55-IC eller deler av p55-IC, eller som en kontroll, luciferase (LUC) (som hver er angitt helt til venstre på fig. 7), ved anvendelse av en tetracyklinkontrollert ekspresjonsvektor. De åpne søylene (venstre, midtre og høyre) står for celler transfektert i nævær av tetracyklin (1 µg/ml), som hemmer ekspresjon, og de fylte kolonnene (venstre, midtre og høyre) representerer celler transfektert i fravær av tetracykliln. TNF reseptorekspresjon ble undersøkt 20 timer etter transfeksjon, både ved ELISA ved anvendelse av antistoffer mot reseptorens ekstracellulære område (se skjematisk illustrasjon på venstre side i fig. 7) og ved bestemmelse av bindingen av radiomerket TNF av cellene (midten). Den cytocidale effekten av de transfekterte proteinene ble undersøkt 48 timer etter transfeksjon. De viste data er fra et av tre eksperimenter med kvalitativt tilsvarende resultater, i hvilke hvert konstrukt ble testet i duplikat. ND - ikke bestemt.

Av fig. 7 er det således tydelig at ved anvendelse av en ekspresjonsvektor som tillater strengt kontrollert ekspresjon av transfektert cDNA ved en tetracyklinregulert transaktivator (Gossen og Bujard, 1992) resulterte en liten økning av p55-R ekspresjon i HeLa celler ved ekspresjon av transienttransfektert cDNA for full-lengde reseptor, i relativt stor celledød. En enda større cytotoksisitet ble observert ved ekspresjon av kun p55-IC. Signifikant cytotoksisitet var også observert ved ekspresjon av kun deler av p55-IC omfattende hovedsakelig "dødsområdet" (restene 328-426) i HeLa celler. På den andre side ekspresjon av deler av p55-IC som manglet "dødsområdet" eller inneholdt bare deler av dette (eller ekspresjon av luciferasegenet, benyttet som en irrelevant kontroll) hadde ingen effekt på cellelevedyktighete. Cytotoksisiteten av p55-IC ble ytterligere bekreftet ved anvendelse av celler stabilt transformert med dets cDNA; disse cellene fortsetter å vokse når p55-IC ekspresjon ikke var indusert, men døde når p55-IC ble uttrykt (se ovenfor).

(c) Andre effekter av det intracellulære området av p55-TNF-R

For å undersøke om andre aktiviteter av TNF blir utløst ved selv-assosiering av det intracellulære området, inkludert derav "dødsområdet", ble effekten av økningen av ekspresjonen av full-lengde reseptor (p55-R) og ekspresjonen av det intracellulære området av reseptoren (p55-IC) på transkripsjonen av interleukin 8 (IL-8), som er kjent

til å bli aktivert av TNF (Matsushima et al., 1988) undersøkt. Resultatene er vist i fig. 8 som viser den liganduavhengige induksjon av IL-8 genekspresjon av HeLa celler transfektert med p55-R eller p55-IC ved anvendelse av et tetracyklinkontrollert konstrukt (se også "General Procedures and Materials" og eksempel 1 ovenfor). I panel A i fig. 8 er der vist en reproduksjon av et Northern blot som viser Northern blot analysen (se "General Procedures and Materials" ovenfor) av RNA (7 µg/spor) ekstrahert fra HeLa (HTta-1) celler, ikke-behandlet ("kontroll") eller behandlet ("TNF") med TNF (500 µg/ml i 4 timer), eller HTta-1 celler 24 timer etter transfeksjon (i nærværet eller fraværet av tetracykllin) med p55-IC ("p55-IC"), p55-R ("p55-R"), eller luciferase ("Luc") cDNA. I panel B i fig. 8 er der vist en reproduksjon av et Northern blot som viser metylenblåfarging av 18S rRNA i hver av prøvene vist i panel A i fig. 8.

Som det er tydelig fra fig. 8, induserte således transfeksjon av HeLa celler med et tetracyklinkontrollert konstrukt som koder for p55-R cDNA, IL8-transkripsjon. Selv en sterkere induksjon ble observert i celler transfektert med cDNA for p55-IC. I begge tilfellene opptrådte induksjon kun når tetracyklin var ekskludert fra celledyrkningsmediet, noe som indikerer at den opptrer som en konsekvens av ekspresjon av det transfekterte p55-R eller p55-IC. Transfeksjon med luciferase cDNA som kontroll, hadde ingen effekt på IL-8 transkripsjon.

Følgelig, fra resultatene ovenfor (fig. 8), synes det som en liten økning i p55-R ekspresjon eller selv ekspresjon kun av det intracelllulære området (p55-IC) derav er tilstrekkelig for å utløse på en ligand (TNF)-uavhengig måte, cytotoksisitet og også andre effekter inkludert den ved en økning i ekspresjonen av IL-8 genet i celler. Utløsningen av disse effektene skyldes sannsynligvis selv-assosieringen av det intracellulære området av p55-R (p55-IC). Som angitt ovenfor, synes det som det etter selv-assosiering av p55-IC at "dødsområdet" er hovedsakelig ansvarlig for signlering av induksjonen av de intracellulære prosessene som fører til utløsning av cytotoksisitet i cellene, mens de andre effektene, for eksempel signalering som fører til induksjonen av IL-8 genekspresjon, sannsynligvis skyldes andre regioner av p55-IC, etter selv-assosiasjon derav. Det er derfor mulig at forskjellige regioner av p55-IC er ansvarlige for forskjellige TNF-induserte effekter (for eksempel cytotoksisitet, IL-8 induksjon) inne i cellene, hvor disse effektene er en konsekvens av den intracellulære signaleringen etter selv-assosiering av p55-IC.

Det faktum at p55-IC kan indusere på en ligand (TNF)-uavhengig måte, utløsningen av andre intracellulære effekter, for eksempel IL-8 induksjon, betyr at p55-IC eller

spesifikke deler derav kan blil benyttet som høyt spesifikke verktøy for å gi effekter i celler eller vev som det er ønskelig å behandle, uten behovet for å behandle slike celler eller vev med TNF. For mange patologiske tilstander (for eksempel malignitet), kan behandling med TNF, spesielt ved høye doser, føre til uønskede bieffekter på grunn av antallet intracellulære effekter indusert systemisk ved TNF etter dets binding til dets reseptorer. Ved hjelp av oppdagelsen ifølge foreliggende oppfinnelse at p55-IC kan etterligne spesifikke andre TNF-induserte effekter (ved siden av cytotoksisitet) for eksempel IL-8 induksjon, åpnes veien for introdusering på en celle- eller vevsspesifikk måte, av p55-IC eller spesifikke deler derav, som vil være i stand til å signalerisere for induksjon av spesifikt ønskede intracellulære effekter, for eksempel IL-8 induksjon, og derved overvinne de systemiske bieffektene som ofte blir observert ved TNF behandling.

(d) Liganduavhengig utløsning av cytocidale effekter i HeLa celler ved de intracellulære områdene og "dødsområdene" derav av p55 TNF-R og FAS-R (Fas/APO1)

Hva angår den cytotoksiske aktiviteten av de intracellulære områdene av p55 TNF-R og FAS-R (pttIC og FAS-IC) har det nå videre blitt utviklet at både p55IC, dets "dødsområde" (p55DD) og FAS-IC er i stand til en liganduavhengig utløsning av et cytocidal effekt i HeLa celler. I denne studien ble HeLa celler transfektert med ekspresjonsvektorer inneholdende forskjellige konstrukter av enten full-lengde p55-TNF-R, deler derav inkludert p55IC og p55DD eller FAS-IC. I et sett eksperimenter ble HeLa celler ko-transfektert med konstrukter inneholdende p55 TNF-R (p55-R) og FAS-IC (for detaljer av konstruktene, deres fremstilling osv., se ovenfor). Resultatene i denne studien er angitt i fig. 9 (A og B), hvor i både fig. 9A og B konstruktene benyttet for transfektering av HeLa celler er vist skjematisk i panelene til venstre; resultatene av TNF eller FAS reseptorekspresjon er vist grafisk i de to midtre panelene (andre og tredje paneler fra venstre), og resultatene for transfekterte celleoverlevelse er vist grafisk i panelet til høyre. I fig. 9A er det vist resultatene av transfekterte HeLa celler som transientuttrykker full-lengde p55-R, p55-IC eller deler derav, eller som en kontroll, luciferase (LUC), i alle tilfeller ved anvendelse av en tetracyklilnkontrollert ekspresjonsvektor. I fig. 9B er det vist resultatene av transfekterte HeLa celler som transientuttrykker FAS-IC alene eller sammen med p55-R ved anvendelse av en tetracyklinkontrollert ekspresjonsvektor. I den grafiske representasjonen i fig. 9A og B representerer åpne søyler celler transfektert i nærvær av tetracyklin (1 μg/ml), som hemmer ekspresjon, og de fylte søylene representerer celler transfektert i fraværet av tetracyklin. TNF reseptorekspresjon ble målt 20 timer etter transfeksjon både ved

ELISA ved anvendelse av antistoffer mot det ekstracellulære området av reseptoren (se panelene på venstre side), og ved bestemmelse av bindingen av radiomerket TNF til cellene (midtre paneler). Den cytocidale effekten av de transfekterte proteinene ble målt 48 timer etter transfeksjon. De viste data er fra et av tre eksperimenter med kvalitativt tilsvarende resultater hvor hvert konstrukt blir testet i duplikat. Betegnelsen "ND" i fig. 9A og B betyr ikke bestemt. Fra resultatene vist i fig. 9A og B er det tydelig at ekspresjon av kun p55IC resulterer i enda større cytotoksisitet. Signifikant cytotoksisitet kan også opptre ved ekspresjon av kun dødsområdet (p55DD). Derimot hadde ekspresjon av deler av p55IC som mangler dødsområdet eller inneholdt kun deler derav, ingen effekt på celleoverlevelsen. Ekspresjon av FAS-IC resulterte ikke i signifikant cytotoksisitet, selv om den signifikante økte cytotoksisiteten til ko-ekspresserte p55-R.

EKSEMPEL 3:

Ytterligere proteiner som er i stand til binding til de intracellulære områdene av p55 TNF-R eller FAS-R

Ved bruk av den samme angrepsmåte og teknologi som angitt i eksempel 1 ovenfor, ble tre ytterligere proteiner isolert og identifisert til å være i stand til å binde til p55IC eller FAS-IC.

I fig. 10-12 er det vist skjematisk den delvise og preliminære nukleotidsekvensen til cDNA kloner, kalt F2, F0 og DD11.

Kloner F2 og F9 ble isolert ved screening av murint (mus) embryonisk bibliotek ved anvendelse av murint FAS-IC som "åte ". I fig. 10 er det skjematisk vist den delvise nukleotidsekvensen fra F2 cDNA som hadde blitt sekvensert. I fig. 11 er det skjematisk vist den delvise nukleotidsekvensen til 1724 baser fra F9 cDNA som hadde blitt sekvensert. Analyse av bindingsevnen av proteinet kodet ved kloner F2 og F9 (F2 og F9 henholdsvis) har vist at:

(a) F2 vekselvirker sterkt med humant p55IC og p55DD og med murint FAS-IC, mens det vekselvirker svakt med ikke-relevante (kontroll) proteiner SNF1 og lamin så vel som relevant protein, humant FAS-IC.

(b) F9 vekselvirker sterkt med humant p55-IC og murint FAS-IC, mens det vekselvirker svakt med humant FAS-IC (relevant protein) og irrelevante proteiner SNF1 og lamin.

(c) Hverken F2 eller F9 vekselvirket i det hele tatt med humant p75IC, pGBT9 (tom åtevektor) eller humant CD-40.

Videre fra "Gene Bank" og "Protein Bank" søk ble det avslørt at F2 og F9 representerer nye proteiner.

F2 og F9 representerer således nye proteiner som hadde bindingsspesifisitet for både FAS-IC og p55IC.

Klone DD11 ble isolert ved screening av et human HeLa bibliotek ved anvendelse av humant p55DD som "åte". I fig. 12 er det vist skjematisk den delvise nukleotidsekvensen av 425 baser fra DD11 cDNA som hadde blitt sekvensert.

DD11 klonen har en omtrentlig lengde på 800 nukleotider. Den fulle lengden av transkriptet er omtrent 1,2 kb, hvor transkripet har blitt prøvet ved anvendelse av klonen. Analyse av bindingsevnen til proteinet kodet ved klone DD11 har vist at DD11 vekselvirker sterkt med p55DD (aminosyrer 326-414) (se fig. 9) og vekselvirker ikke med delesjonsmutanter i dette området, for eksempel aminosyrer 326-404. DD11 vekselvirker også med mus og humant FAS-IC og til en viss grad med lamin. DD11 vekselvirker ikke i det hele tatt med SNF1 eller med pGBT9 (tom åtevektor). DD11 ble heller ikke funnet i "Gene Bank" og "Protein Bank" databaser. DD11 representerer således et p55 IC (p55DD) og FAS-IC spesifikt bindende protein.

EKSEMPEL 4

Konstruksjon av oppløselige dimere TNF reseptorer

Basert på funnene angitt i eksempel 2 ovenfor at det intracellulære området av p55-R (p55-IC) og en del derav ("dødsområdet") og at det intracellulære området av Fas/APO1 og en del derav (også kalt "dødsområdet") som tilsvarer p55-IC "dødsområdet", er i stand til selv-assosiering, er det mulig å konstruere nye TNF reseptorer som er i stand til selv-assosisering (aggregering) og som er oppløselige. Slike TNF reseptorer vil være fusjonsproteiner som har hovedsakelig hele det ekstracellulære området av p55-R sammensmeltet med hovedsakelig alle de intracellulære områdene eller "dødsområdene" derav av p55-R eller Fas/APO1. Slike fusjonskonstrukter vil således være uten det transmembrale området av p55-R (eller FAS/APO1) og således være oppløselig. Videre ved hjelp av selv-assosieringsevnen til de intracellulære områdene eller "dødsområdene" vil disse fusjonskonstruktene være i stand til oligomerisering for å gi minst dimere (og

muligens også høyere ordens multimerer) av p55-R. Følgelig vil slike dimere TNF reseptorer (p55-R) være i stand til binding til minst to TNF monomerer av naturlig forefinnende TNF homotrimer for å gi en oppløselig TNF reseptor som binder kraftigere til dets ligand (homotrimer TNF).

Følgelig vil minst fire typer av p55 TNF reseptor fusjonsproteiner bli konstruert, hvert av hvilke vil være i stand til oligomerisering og vil være oppløselig:

(i) Et fusjonsprodukt mellom det ekstracellulære området av p55-R (EC55) og det intracellulære området av p55-R (p55-IC);

(ii) Et fusjonsprodukt mellom EC55 og "dødsområdet" av p55-IC (DD55);

(iii) Et fusjonsprodukt mellom EC55 og det intracellulære området av Fas/APO1 (ICFAS); og

(iv) Et fusjonsprodukt mellom EC55 og "dødsområdet" av ICFAS (DDFAS).

I hvert av fusjonsproteinene ovenfor blir TNF monomerbindekapasitet gitt ved EC55 delen mens oligomerisering (eller i det minst dimeriseringen) av hver type av fusjonsprotein bli gitt ved dets "hale" region som er en hvilken som helst av p55IC, DD55, ICFAS eller DDFAS delene.

For konstruksjon av fusjonsproteinene ovenfor vil standard teknikker av rekombinant DNA teknologi bli benyttet som nå er vel etablert i teknikken (se for eksempel Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), en hvilken som helst passende bakterie, bakteriofag eller animalsk virusekspresjonsvektor (klonebærer eller plasmid utformet for ekspresjon av det innsatte DNA) blir benyttet i hvilken det blir satt inn i ett eller flere av trinnene DNA som koder for EC55 og en av "halene" som er p55.IC, DD55, ICFAS eller DDFAS. Det således innsatte DNA som koder for hvert av fusjonsproteinene vil bli plassert under kontroll av forskjellige ekspresjonskontrollerende sekvenser av klonebæreren eller plasmidet slik som promotere, ribozymbindeseter, transkripsjonelle faktorbindeseter osv. Disse ekspresjonskontrollerende sekvensene vil bli valgt avhengig av typen ekspresjonsvektor som er valgt og således typen vertcelle (eukaryote eller prokaryote) i hvilken det er

ønskelig å uttrykke fusjonsproteinene. Foretrukne vertceller (og således ekspresjonsvektorer) er eukaryote, spesielt mammalske.

DNA molekylet som koder for hvert av de ovenfor angitte fusjonsproteinene vil bli fremstilt og satt inn i ekspresjonsvektoren ved den følgende prosedyren:

(a) Først vil et sett oligonukleotider for anvendelse i PCR bli konstruert ved standard midler, hvor oligonukleotidene er:

1) ACC ATG GGC CTC TCC ACC GTG (EC55, sens)
2 ACGC GTC GAC TGT GGT GCC TA GTC CTC (EC55, antisens)
3) ACGC GTC GAC CGC TAC CAA CGG TGG AAG (IC55, sens)
4) TCA TCT GAG AAG ACT GGG (IC55, antisens)
5) ACGC GTC CAG AAG AGA AAG GAAA GTA CAG (IC FAS, sens)
6) CTA GAC CAA GCT TTG GAT (IC FAS, antisens)
7) ACGC GTC GAC CCC GCG ACG CTG TAC GCC (DD55, sens)
8) ACGC GTC GAC GAT GTT GAC TTG AGT AAA (DD FAS, sens)

(b) Plasmider inneholdende de klonede full-lengde p55-R og Fas/APO1 reseptorene som søkerene har i laboratoriet (se også paralleltløpende EP568925 og eksemplene 1-3 ovenfor) vil bli utsatt for de følgende manipulasjoner for å gi DNA fragmentene som koder for hvert av fusjonsproteinene, hvis DNA fragmenter så blir ligert inn i de ovenfor angitte valgte ekspresjonsvektorene:

(i) For å fremstille DNA fragmentet som koder for EC55 som er en komponent av alle 4 fusjonsproteinene, blir PCR utført på et plasmid som bærer cDNA av humant p55 ved anvendelse av oligonukleotidene nr. 1 og 2 ovenfor (størrelse av fragment 640 bp).

(ii) For å få et fusjonsprodukt EC55-IC55, blir PCR utført på et plasmid som bærer cDNA for humant p55 ved anvendelse av oligonukleotidene nr. 3 og 4 for å oppnå et DNA fragment som koder for IC55 (størrelse 677 bp) som så blir blandet med EC55 kuttet ved Sal I og ligert ved buttendeligering inn i en hvilken som helst ekspresjonsvektor for mammalske celler under kontroll av en passende promoter. Orienteringen av det innsatte EC55--IC55 i vektoren blir verifisert for restriksjonskutting og ved sekvensering.

(iii) For å få et fusjonsprodukt EC55--IC FAS, blir IC FAS produsert ved PCR på et plasmid med cDNA for FAS ved anvendelse av oligonukleotidene nr. 5 og 6 for å oppnå et fragment (størrelse 448 bp) som så blir kuttet med Sal I og blandet med EC55 kuttet ved SalI og deretter buttendeligert inn i en mammalsk ekspresjonsvektor under kontroll av en passende promoter. Orienteringen av den innsatte EC55--IC FAS i vektoren blir verifisert ved restriksjonskutting og ved sekvensering.

(iv) For å få et fusjonsprodukt EC55--DD55 blir et DNA fragment produsert med DD55 sekvensen ved PCR i cDNA for humant p55 ved anvendelse av oligonukleotider nr. 7 og 4. Produktet med en størrelse på 314 bp blir kuttet med SalI og blandet med EC55 kuttet med SalI og deretter buttendeligert inn i den mammalske ekspresjonsvektoren. Orientering av det innsatte EC55-DD55 i vektoren blir verifisert ved restriksjonskutting og sekvensering.

(v) For å få et fusjonsproduktet EC55--DD FAS, blir et DNA fragment med DD FAS produsert ved PCR på cDNA for FAS ved anvendelse av oligonukleotidene nr. 6 og 8. Produktet med en størrelse på 332 bp blir kuttet med SalI og blandet med EC55 kuttet ved SalI og deretter buttendeligert inn i den mammalske ekspresjonsvektoren. Orienteringen av EC55--FAS blir så verifisert ved restriksjonskutting og sekvensering.

Straks ekspresjonsvektorene ovenfor har blitt konstruert, vil de så bli innført ved standard metoder i passende mammalske celler (for eksempel kinesisk hamsterovarie (CHO) eller apenyre (COS) celler) for ekspresjonsformål. De således uttrykte fusjonsproteinene vil så bli renset ved standard metoder (se paralleltløpende søknader EP308378; EP398327 og EP568925). De rensede fusjonsproteinene vil så bli analysert for deres evne til å oligomerisere (og graden derav, dvs. om de danner dimerer eller høyere ordens multimerer) og for deres evne til å binde TNF (og affiniteten eller styrken av bindingen derav).

EKSEMPEL 5

Konstruksjon av oppløselie dimere Fas/APO1 reseptorer

På en tilsvarende måte som angitt i eksempel 4 ovenfor er det mulig å produsere de fire følgende fire typene Fas/APO1 fusjonsprodukter, hver av hvilke vil være i stand til oligomerisering og vil være oppløselig:

(i) Fusjonsprodukt mellom det ekstracellulære området av Fas/APO1 (EC FAS) og det intracellulære området av p55-IC;

(ii) Fusjonsprodukt mellom EC FAS og "dødsområdet" av p55-IC (DD55);

(iii) Fusjonsprodukt mellom EC FAS og det intracellulære området av Fas/APO1 (IC FAS); og

(iv) Fusjonsprodukt mellom EC FAS og "dødsområdet" av IC FAS (DD FAS).

I hvert av fusjonsproteinene ovenfor blir den FAS ligandbindende evnen gitt ved EC FAS delen, mens oligomeriseringen (eller i det minste dimeriseringen) av hver type fusjonsprotein gitt ved dets "hale" region som er en hvilken som helst av p55-IC, DD55, IC FAS eller DD FAS delene.

Konstruksjonen av DNA fragmentene som koder for fusjonsproteinene ovenfor og ekspresjonsvektorene inneholdende dem vil være som angitt i eksempel 4, bortsett fra at forskjellige passende oligonukleotider (ikke vist) vil bli benyttet for fremstilling av EC FAS fragmentet som skal ligeres til en hvilken som helst av de ovenfor angitte "hale" regioner. Deretter vil ekspresjonsvektorene bli innført i de passende vertcellene og de resulterende uttrykte fusjonsproteinene vil bli renset og testet ved deres evne til å oligomerisere (eller graden derav, dvs. om de danner dimerer eller høyere ordens dimerer) og for deres evne til å binde FAS liganden (og affiniteten eller graden av bindingen derav).

EKSEMPEL 6

Konstruksjon av oppløselige oligomere "blandede" TNF/FAS reseptorer

For å fremstille oligomere reseptorer som har "blandet" affinitet, dvs. affinitet for både TNF og FAS-R liganden, kan de ovenfor nevnte (eksempler 4 og 5) fusjonsproduktene bli benyttet i den følgende prosedyre:

i) Fremskaffing av et fusjonsprodukt som angitt i eksempel 4 som inneholder det ekstracellulære området av en TNF-R (p75 TNF-R eller p55 TNF-R) sammensmeltet ved en hvilken som helst av: p55 IC, FAS-IC, p55 DD eller FAS DD;

ii) Fremskaffing av et fusjonsprodukt som angitt i eksempel 5 som inneholder det ekstracellulære området av Fas-R sammensmeltet med et hvilket som helst av: p55 IC, FAS-IC, p55 DD eller FAS-DD; og

iii) Blanding av et hvilket som helst av fusjonsproduktene fra i) med et hvilket som helst av fusjonsproduktene av ii) for å fremskaffe en ny dimer (eller høyere ordens oligomer) reseptor som har både de ekstracellulære områdene av en TNF-R og FAS-R som er sammenbundet ved deres -IC eller -DD regioner.

I prosedyren ovenfor kan fusjonsproduktene av i) og ii) bli fremskaffet separat, nemlig for deres rensing fra transformerte celler i hvilke de blir produsert, og så blandet *in vitro* for å oppnå de blandede affinitetsreseptorene. Alternativt kan vertcellene bli ko-transfektert med vektorer som bærer sekvenser som koder for begge typer fusjonsprodukter, i hvilket tilfelle de blandede affinitetsreseptorene kan bli oppnådd direkte fra de ko-transfekterte cellene. Den faktiske oligomeriseringen av fusjonsproduktene til oligomere reseptorer kan skje i cellene eller under eller etter rensingsprosedyren for å oppnå fusjonsprodukter uttrykt i cellene. For spesifikt å selektere for de blandede affinitetsreseptorene kan en hvilken som helst standard metode bli benyttet, for eksempel affinitetskromatografiprosedyrer i hvilke antistoffer mot TNF-R og FAS-R ekstracellulære områder blir benyttet i sekvensielle kromatografiske trinn for å selektere for de reseptorene som har begge typer ekstracellulære områder.

REFERANSER

Aderka, D., Englemann, H., Hornik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D. and Kushtai, G. (1991) Cancer Res. 51, 5602-5607.

Baens et al. (1993) Genomics 16:214-218.

Barinaga, M. (1993) Science 2621512-4.

Bartel, P.L., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Bio Techniques 14, 920-924.

Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. and Cullen, B.R. (1988) Gene 66, 1-10.

Beutler, B. and Cerami, C. (1987) NEJM, 316:379-385.

Boldin, M.P. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 337-341.

Bollon, D.P. et al. (1980) J. Clin. Hematol. Oncol. 10, 39-48.

Botstein, D. et al. (1982) Miami Wint. Smyp. 19, 265-274.

Brakebusch, C. et al. (1992) EMBO J., 11:943-950.

Broach, J.R. (1981) in : The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces : Life Cycle and Inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 445-470.

Broach, J.R. (1982) Cell 28, 203-204.

Brockhaus, M. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3127-3131.

Cantor, G.H. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10932-6.

Chater, K.F. et al. (1986) in : Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kaido, Budapest, Hungary, 45-54.

Chen, C.J. et al. (1992) Ann N.Y. Acad. Sci. 660:271-3.

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C. Shapiro, J.P. Brauer, M., Kiefer, M.C., Barr, P.J. and Mountz, J.D. (1994) Science 263, 1759-1762.

Crisell, P. et al., (1993) Nucleic Acids Res. (England) 21 (22):5251-5.

Crowe, F.D. et al., (1994) Science, 264:707-709.

Current protocols in molecular biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., eds.), (1994) pp. 8.1.1-8.1.6 and 16.7-16.7.8, Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.

DeMartino, G.N. Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C. and Slaughter, C.A. (1994) J. Biol. Chem. 269, 20878-20884.

Dirks, W., Wirth, M. and Hauser, H. (1993) Gene 128, 247-249.

Endo, H., Akahoshi, T., Nishimura, A., Tonegawa, M., Takagishi, K., Kashiwazaki, Matsushima, K. and Kondo, H. (1994) Clin. Exp. Immunol. 96, 31-35.

Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:1531-1536.

Ferrick, M.R., Thurau, S.R., Oppenheim, M.H., Herbort, C.P., Ni, M., Zachariae, C.P.,

Matsushima, K. and Chan, C.C. (1991) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32, 1534-1539.

Fields, S. and Song, O. (1989) Nature, 340:245-246.

Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993) Anal. Biochem. 210, 179-187.

Glick, B.R. (1987) J. Ind. Microbiol. 1, 277-282.

Goodwin, R.G., Anderson, D., Jerzy, R., David, T., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Smith, C.A. (1991) Mol. Cell Biol. 11, 3020-3026.

Gossen, M. and Boujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551.

Gryczan, T. (1982) The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, N.Y. 307-329.

Guarente, L. (1983) in Methods Enzymol. 101, 181-191.

Harada, A., Sekido, N., Kuno, A., Akiyama, M., Kasahara, T., Nakanishi, I., Mukaid, and Matsushima K. (1993) Int. Immunol. 5, 681-690.

Heller, R.A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6151-6155.

Hohmann, H.-P. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264:14927-14934.

Holtmann, H. and Wallach, D. (1987) J. Immunol. 139, 1161-1167.

Itoh, N. et al. (1991) Cell 66:233.

Itoh, N. and Nagata, S. (1993) J. Biol. Chem. 268, 10932-7.

Izaki, K. (1978) Jpn. J. Bacteriol. 33, 729-742.

John, J.F. et al. (1986) Rev. Infect. Dis. 8, 693-704.

Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) J. Biol. Chem. 268:24515-8.

Kendall, K.J. et al (1987) J. Bacteriol 169, 4177-4183.

Khan, A.S. et al. (1992) Nature *Genetics*, 2: 180-185.

Koizumi, M. et al. (1993) Biol. Pharm. Bull (Japan) 16 (9):879-83.

Kunkel, T.A. (1994) in : Current protocols in molecular biology, pp. 8.1.1-8.1.6 (Ausubel, F.M. et al., eds.) Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.

Loetscher, H., Pan, Y-C.E., Lahm, H.-W, Gentz, R., Brockhaud, M., Tabuchi, H. and Lesslauer, W. (1990) Cell, 61:351-359.

Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Maniatis, T. (1980) in : Cell Biology : A Comprehensive Treatise Vol. 3 : Gene Expression, Academic Press, N.Y. 563-608.

Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J. and Oppenheim, J.J. (1988) J. Exp. Med. 167, 1883-1893.

Nophar, Y. et al. (1990) EMBO J., 9:3269-3278.

Oehm, A. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:10709.

Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y.,

Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993) Nature 364, 806-809.

Okayama, H. (1983) Mol. Cell Biol. 3, 280.

O'Neal, K.D. and Yu-Lee, L.Y. (1993) Lymphokine Cytokine Res. 12, 309-312.

Piquet, P.F. t al. (1987) J. Exp. Med., 166:1280-89.

Realini, C., Rogers, S.W. and Rechsteiner, M. (1994) FEBS Lett 348, 109-113.

Rechsteiner, M., Hoffman, L. and Dubiel, W. (1993) J. Biol. Chem. 268, 6065-6068.

Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring HarborLaboratory Press, Cold spring Harbor, NY.

Schall, T.J. et al. (1990) Cell, 61:361-370.

Schwalb et al. (1993) J. Biol. Chem. 268 (14) :9949-54.

Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) FASEB J. in press.

Sekido, N., Mujaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., Matsushima, K. (1993) Nature 365, 654-657.

Shimayama, T. et al., (1993) Nucleic Acids Symp. Ser. 29:177-8

Shore, S.K. et al. (1993) Oncogene 8:3183-8.

Smith, C.A., David, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D. and Goodwin, R.G. (1990) Science, 248:1019-1023.

Smith, D.B. and Corcoran, L.M. (1994) in : Current protocols in molecular biology, pp. 16.7.1-16.7.8 (Ausubel, F.M. et al., eds.) Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc. New York.

Song, H.Y. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 22492-22495.

Stamenkovic, I., Clark, E.A. and Seed, B. (1989) Embo J. 8:1403-1410.

Tartaglia, L. A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) Cell, 74:845-853.

Tracey, J.T. et al. (1987) Nature, 330:662-664.

Wallach, D. (1984) J. Immunol. 132, 2464-9.

Wallach, D. (1986) in Interferon 7 (Ion Gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, London

Wallach, D. et al. (1994) Cytokine 6, 556.

Watanabe-Fukanaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nagata, S. (1992) J. Immunol. 148, 1274-1279.

Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) Nature, 356, 314-317.

Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Kronke, M. (1994) Cell 78, 1005-1015.

Wilks, A.F. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1603-1607.

Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) Nature (England) 365:448-51.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON

(i) SØKER: YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. at the Weizmann Institute of Science
(B) ADR.: P.O.Box 95
(C) BY: Rehovot
(E) LAND: Israel
(F) POSTKODE: (ZIP) : 76100
(G) TELEFON: 011-972-847-0617
(H) TELEFAX: 011-972-847-0733

(A) NAVN: Henry WEINWURZEL
(B) GATE: Herzl Street 43
(C) BY: Raanana
(E) LAND: Israel
(F) POSTKODE: (ZIP) : 43353

(A) NAVN: David WALLACH
(B) GATE: 24 Borochov Street
(C) BY: Rehovet
(E) LAND: Israel
(F) POSTKODE (ZIP) : 76406

(A) NAVN: Mark BOLDIN
(B) GATE: Zelenograd 927-53
(C) BY: Moskva
(E) LAND: Russland
(F) POSTKODE (ZIP) : 103575

(A) NAVN: Ugor METT
(B) GATE: 60 Levin Epstein Street
(C) BY: Rehovet
(E) LAND: Israel
(F) POSTKODE (ZIP) : 76462

(A) NAVN: Eugene VARFOLOMEEV
(B) ADR.: P.O.box 26
(C) BY: Rehovot
(E) LAND: Israel
(F) POSTKODE (ZIP) : 76100

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Modulatorer for TNF/NGF superfamiliereseptorer og oppløselige oligomere TNF/NGF superfamiliereseptorer

(iii) ANTALL SEKVENSER: 24

(iv) KORRESPONDERENDE ADRESSE:
(A) ADRESSE: BROWDY AND NEIMARK
(B) GATE: 419 Seventh Street, N.W., Suite 300
(C) BY: Washington
(D) STAT: D.C.
(E) LAND: USA
(F) ZIP: 20004

(v) COMPUTER-LESBAR FRA:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATIVT SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1,0, Versjon #1,30 (EPO)

(v) RELEVANT SØKNADSDATA:
SØKNADSNUMMER: PCT/US95/05854

(vi) PRIORITETSDATA:
(A) SØKNADSNUMMER: IL 109,632
(B) FILING DATE: 11-MAI-1994

(vi) PRIORITETSDATA:
(A) SØKNADSNUMMER: IL 11,125
(B) INNGIVELSESDATO: 02-OKT-1994

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMASJON:
(A) NAVN: BROWDY, Roger L.
(B) REGISTRERINGSNUMMER: 25,618
(C) REFERANSE/DOCKET NUMMER: WALLACH=15 PCT

(ix) TELEKOMMUNIKASJONSINFORMASJON:
(A) TELEFON: 202-628-5197
(B) TELEFAX: 202-737-3528
(C) TELEX: 248633

(2) **INFORMASJON OM SEQ ID No:**

(i) SEKVENSEGENSKAPER
(A) LENGDE: 21 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkeltstrenget
(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:
ACCATGGGCC TCTCCACCGT G 21

(2) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:
(A) LENGDE: 28 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2

ACGCGTCGAC TGTGGTGCCT GAGTCCTC 28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3
(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LENGDE: 28 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 3:

ACGCGTCGAC CGCTACCAAC GGTGGAAG 28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:
(A) LENGDE: 18 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 4:

TCATCTGAGA AGACTGGG 18

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5:
(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:
(A) LENGDE: 28 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 5:

ACGCGTCGAC AAGAGAAAGG AAGTACAG 28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 18 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 6:

CTAGACCAAG CTTTGGAT 18

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 28 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 7:

ACGCGTCGAC CCCGCGACGC TGTACGCC 28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 28 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 8:

ACGCGTCGAC GATGTTGACT TGAGTAAA 28

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 2866 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 9:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

ATTCGGGTGC AGCCCCAGCA GTCTCCAGCG GCGGCCCCCG GCGGCACGGA CGAGAAGCCG 60

AGCGGCAAGG AGCGGCGGGA TGCCGGGGAC AAGGACAAAG AACAGGAGCT GTCTGAAGAG 120

GATAAACAGC TTCAAGATGA ACTGGAGATG CTCGTGGAAC GACTAGGGGA GAAGGATACA 180

TCCCTGTATC GACCAGCGCT GGAGGAATTG CGAAGGCAGA TTCGTTCTTC TACAACTTCC 240

ATGACTTCAG TGCCCAAGCC TCTCAAATTT CTGCGTCCAC ACTATGGCAA ACTGAAGGAA 300

ATCTATGAGA ACATGGCCCC TGGGGAGAAT AAGCGTTTTG CTGCTGACAT CATCTCCGTT 360

TTGGCCATGA CCATGAGTGG GGAGCGTGAG TGCCTCAAGT ATCGGCTAGT GGGCTCCCAG 420

GAGGAATTGG CATCATGGGG TCATGAGTAT GTCAGGCATC TGGCAGGAGA AGTGGCTAAG 480

GAGTGGCAGG AGCTGGATGA CGCAGAGAAG GTCCAGCGGG AGCCTCTGCT CACTCTGGTG 540

AAGGAAATCG TCCCCTATAA CATGGCCCAC AATGCAGAGC ATGAGGCTTG CGACCTGCTT 600

ATGGAAATTG AGCAGGTGGA CATGCTGGAG AAGGACATTG ATGAAAATGC ATATGCAAAG 660

GTCTGCCTTT ATCTCACCAG TTGTGTGAAT TACGTGCCTG AGCCTGAGAA CTCAGCCCTA 720

CTGCGTTGTG CCCTGGGTGT GTTCCGAAAG TTTACCCGCT TCCCTGAAGC TCTGAGATTG 780

GCATTGATGC TCAATGACAT GGAGTTGGTA GAAGACATCT TCACCTCCTG CAAGGATGTG 840

GTAGTACAGA AACAGATGGC ATTCATGCTA GGCCGGCATG GGGTGTTCCT GGAGCTGAGT 900

GAAGATGTCG AGGAGTATGA GGACCTGACA GAGATCATGT CCAATGTACA GCTCAACAGC 960

AACTTCTTGG CCTTAGCTCG GGAGCTGGAC ATCATGGAGC CCAAGGTGCC TGATGACATC 1020

TACAAAACCC ACCTAGAGAA CAACAGGTTT GGGGGCAGTG GCTCTCAGGT GGACTCTGCC 1080

CGCATGAACC TGGCCTCCTC TTTTGTGAAT GGCTTYGTGA ATGCAGCTTT TGGCCAAGAC 1140

AAGCTGCTAA CAGATGATGG CAACAAATGG CTTTACAAGA ACAAGGACCA CGGAATGTTG 1200

AGTGCAGCTG CATCTCTTGG GATGATTCTG CTGTGGGATG TGGATGGTGG CCTCACCCAG 1260

ATTGACAAGT ACCTGTACTC CTCTGAGGAC TACATTAAGT CAGGAGCTCT TCTTGCCTGT 1320

GGCATAGTGA ACTCTGGGGT CCGGAATGAG TGTGACCCTG CTCTGGCACT GCTCTCAGAC 1380

TATGTTCTCC ACAACAGCAA CACCATGAGA CTTGGTTCCA TCTTTGGGCT AGGCTTGGCT 1440

TATGCTGGCT CAAATCGTGA AGATGTCCTA ACACTGCTGC TGCCTGTGAT GGGAGATTCA 1500

AAGTCCAGCA TGGAGGTGGC AGGTGTCACA GCTTTAGCCT GTGGAATGAT AGCAGTAGGG 1560

TCCTGCAATG GAGATGTAAC TTCCACTATC CTTCAGACCA TCATGGAGAA GTCAGAGACT 1620

GAGCTCAAGG ATACTTATGC TCGTTGGCTT CCTCTTGGAC TGGGTCTCAA CCACCTGGGG 1680

AAGGGTGAGG CCATCGAGGC AATCCTGGCT GCACTGGAGG TTGTGTCAGA GCCATTCCGC 1740

AGTTTTGCCA ACACACTGGT GGATGTGTGT GCATATGCAG GCTCTGGGAA TGTGCTGAAG 1800

GTGCAGCAGC TGCTCCACAT TTGTAGCGAA CACTTTGACT CCAAAGAGAA GGAGGAAGAC 1860

AAAGACAAGA AGGAAAAGAA AGACAAGGAC AAGAAGGAAG CCCCTGCTGA CATGGGAGCA 1920

CATCAGGGAG TGGCTGTTCT GGGGATTGCC CTTATTGCTA TGGGGGAGGA GATTGGTGCA 1980

GAGATGGCAT TACGAACCTT TGGCCACTTG CTGAGATATG GGGAGCCTAC ACTCCGGAGG 2040

GCTGTACCTT TAGCACTGGC CCTCATCTCT GTTTCAAATC CACGACTCAA CATCCTGGAT 2100

ACCCTAAGCA AATTCTCTCA TGATGCTGAT CCAGAAGTTT CCTATAACTC CATTTTTGCC 2160

ATGGGCATGG TGGGCAGTGG TACCAATAAT GCCCGTCTGG CTGCAATGCT GCGCCAGTTA 2220

GCTCAATATC ATGCCAAGGA CCCAAACAAC CTCTTCATGG TGCGCTTGGC ACAGGGCCTG 2280

ACACATTTAG GGAAGGGCAC CCTTACCCTC TGCCCCTACC ACAGCGACCG GCAGCTTATG 2340

AGCCAGGTGG CCGTGGCTGG ACTGCTCACT GTGCTTGTCT CTTTCCTGGA TGTTCGAAAC 2400

ATTATTCTAG GCAAATCACA CTATGTATTG TATGGGCTGG TGGCTGCCAT GCAGCCCCGA 2460

ATGCTGGTTA CGTTTGATGA GGAGCTGCGG CCATTGCCAG TGTCTGTCCG TGTGGGCCAG 2520

GCAGTGGATG TGGTGGGCCA GGCTGGCAAG CCGAAGACTA TCACAGGGTT CCAGACGCAT 2580

ACAACCCCAG TGTTGTTGGC CCACGGGGAA CGGGCAGAAT TGGCCACTGA GGAGTTTCTT 2640

CCTGTTACCC CCATTCTGGA AGGTTTTGTT ATCTTCGGAA GAACCCCAAT TATGATCTCT 2700

AAGTGACCAC CAGGGGCTCT GAACTGCAGC TGATGTTATC AGCAGGACAT GCATCCTGCT 2760

GCCAAGGGTG GACACGGCTG CAGACTTCTG GGGGAATTGT CGCCTCCTGC TCTTTTGTTA 2820

CTGAGTGAGA TAAGGTTGTT CAATAAAGAC TTTTATCCCC AAGGTC 2866

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE; 676 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 10:

GAATTCGGCA CGAGCGGCAC GAGGACAGAG TGAGACTCTG TCTCTTAAAA TAATAATAAA 60

AATAAAAATA AAATGTGGGG CCGGGCAAGG TGGCTCATGC CTGTAATCCC AGCACCTTGG 120

GAGGCTGAGG CAGGAGGATT GCCTAAGCCC AGGAGTTTGA CATCAGCCTG GGCAACATGG 180

TGAAACCCCA TCTCTACAAA AAATGCAAAA ATTAGCCAGG TGTGGTGGGT GTGCTCCTAT 240

AGTCTCAGCT ACTCAGGAGG CTGAGGTAGA GGGGATCACC TGAGCCCAGG AAGTTTGGAG 300

GCTATAGTGA GCTGAAGACC CGCACCATTG CACGCCAGCC TGGAGCAAGA GACNCTGTCT 360

CCACATAAAT AAATAAATAA ATAAAAGTGG GGAACTTCTG TGTTAAGTCA GAAGGCACCA 420

CACAATTTGN ATAGCCANCA ACCATATTCA ATACCCAATC TCTTTATTGC AATATAAGTA 480

TTTGTAAACC CCTACACAAA TATTCCCAAG AATAAGTTGG AATATAAATT ACTATATCAA 540

TCANCCAATA AAAATAAACA CATACAGTAT TTATTTCCTG TTGCTCCATA TAAAGCTTTG 600

CTATTTCAAT ATAAAGCTTA CCTAGTATGG TCATTTGAGC CTGAGCAGAG AATATGCCCA 660

AGCTCGTGCC GAATTC 676

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 1153 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 11:

GGCGNTCTGA CTCTCTACTG AACCAAGACT GAATCAGAGA GACTCGAGTG CNCTTATTTG 60

ATTAANCCCA AATTATTGAA ACCTNTGATT TTTTCTGGAG GNGGATGATA AAGATGTGAA 120

AGTGTGATGA ACAGTGTGTA TCCCTACTCT TGATCCTGGA ACCAGACAAG CAAGAAGCTT 180

TGATTGAAAG CCTATGTGAA AAGCTGGTCA AATTTCGCGA AGGTGAACGC CCGTCTCTGA 240

GACTGCAGTT GTTAAGCAAC CTTTTCCACG GGATGGATAA GAATACTCCT GTAAGATACA 300

CAGTGTATTG CAGCCTTATT AAAGTGGCAG CATCTTGTGG GGCCATCCAG TACATCCCAA 360

CTGAGCTGGA TCAAGTTAGA AAATGGATTT CTGACTGGAA TCTCACCACT GAAAAAAAGC 420

ACACCCTTTT AAGACTACTT TATGAGGCAC TTGTGGATTG TAAGAAGAGT GATGCTGCTT 480

CAAAAGTCAT GGTGGAATTG CTCGGAAGTT ACACAGAGGA CAATGCTTCC CAGGCTCGAG 540

TTGATGCCCA CAGGTGTATT GTACGAGCAT TGAAAGATCC AAATGCATTT CTTTGTGACC 600

ACCTTCTTAC TTTAAAACCA GTCAAGTTTG TGGAAGGCGA GCTTATTCAT GATCTTTTAA 660

CCATTTGTGT GAGTGCTAAA TTGGCATCAT ATGTCAAGTT TTATCAGAAT AATAAAGACT 720

TCATTGATTC ACTTGGCCTG TTACATGAAC AGAATATGGC AAAAATGAGA CTACTTACTT 780

TTATGGGAAT GGCAGTAGAA AATAAGGAAA TTTCTTTTGA CACAATGCAG CAAGAACTTC 840

AGATTGGAGC TGATGATGTT GAAGCATTTG TTATTGACGC CGTAAGAACT AAAATGGTCT 900

ACTGCAAAAT TGATCAGACC CAGAGAAAAG TAGTTGTCAG TCATAGCACA CATCGGACAT 960

TTGGAAAACA GCAGTGGCAA CAACTGTATG ACACACTTAA TGCCTGGAAA CAAAATCTGA 1020

ACAAAGTGAA AAACAGCCTT TTGAGTCTTT CTGATACCTG AGTTTTTATG CTTATAATTT 1080

TTGTTCTTTG AAAAAAAAGC CCTAAATCAT AGTAAAACAT TATAAACTAA AAAAAAAAAA 1140

AAAAAAACTC GAG 1153

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 12:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 220 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 12:

GTCCGGTTTA CTTTAACTTA GTTTTGCATA GTTCTAGTGC ACGTGAAATT GAAAAGTTAT 60

TTCCCTTTAG CTGTGTTATT ATAGAGCAGA AATTCTGTTT TTAAAAATTA GCCTAAGATA 120

TACTTGTTTT TGTAAAGAAA AATATTTAAT GCTTGAACAA AATAAATTGG AGTTGGAGTA 180

GAATGTAGTT TGAGGAAATT TGCAGCTTCC AATGCCTCTG 220

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 13:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 220 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 13:

CAGAGGCATT GGAAGCTGCA AATTTCCTCA AACTACATTC TACTCCAACT CCAATTTATT 60

TTGTTCAAGC ATTAAATATT TTTCTTTACA AAAACAAGTA TATCTTAGGC TAATTTTTAA 120

AAACAGAATT TCTGCTCTAT AATAACACAG CTAAAGGGAA ATAACTTTTC AATTTCACGT 180

GCACTAGAAC TATGCAAAAC TAAGTTAAAG TAAACCGGAC 220

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 14:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 900 aminosyrer

(B) TYPE: Aminosyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: Protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 14:

Arg Val Gln Pro Gln Gln Ser Pro Ala Ala Ala Pro Gly Gly Thr Asp
1 5 10 15

Glu Lys Pro Ser Gly Lys Glu Arg Arg Asp Ala Gly Asp Lys Asp Lys
20 25 30

Glu Gln Glu Leu Ser Glu Glu Asp Lys Gln Leu Gln Asp Glu Leu Glu
35 40 45

Met Leu Val Glu Arg Leu Gly Glu Lys Asp Thr Ser Leu Tyr Arg Pro
50 55 60

```
Ala Leu Glu Glu Leu Arg Arg Gln Ile Arg Ser Ser Thr Thr Ser Met
65                  70                  75                  80

Thr Ser Val Pro Lys Pro Leu Lys Phe Leu Arg Pro His Tyr Gly Lys
                85                  90                  95

Leu Lys Glu Ile Tyr Glu Asn Met Ala Pro Gly Glu Asn Lys Arg Phe
            100                 105                 110

Ala Ala Asp Ile Ile Ser Val Leu Ala Met Thr Met Ser Gly Glu Arg
        115                 120                 125

Glu Cys Leu Lys Tyr Arg Leu Val Gly Ser Gln Glu Glu Leu Ala Ser
    130                 135                 140

Trp Gly His Glu Tyr Val Arg His Leu Ala Gly Glu Val Ala Lys Glu
145                 150                 155                 160

Trp Gln Glu Leu Asp Asp Ala Glu Lys Val Gln Arg Glu Pro Leu Leu
                165                 170                 175

Thr Leu Val Lys Glu Ile Val Pro Tyr Asn Met Ala His Asn Ala Glu
            180                 185                 190

His Glu Ala Cys Asp Leu Leu Met Glu Ile Glu Gln Val Asp Met Leu
        195                 200                 205

Glu Lys Asp Ile Asp Glu Asn Ala Tyr Ala Lys Val Cys Leu Tyr Leu
    210                 215                 220

Thr Ser Cys Val Asn Tyr Val Pro Glu Pro Glu Asn Ser Ala Leu Leu
225                 230                 235                 240

Arg Cys Ala Leu Gly Val Phe Arg Lys Phe Thr Arg Phe Pro Glu Ala
                245                 250                 255

Leu Arg Leu Ala Leu Met Leu Asn Asp Met Glu Leu Val Glu Asp Ile
            260                 265                 270

Phe Thr Ser Cys Lys Asp Val Val Val Gln Lys Gln Met Ala Phe Met
        275                 280                 285

Leu Gly Arg His Gly Val Phe Leu Glu Leu Ser Glu Asp Val Glu Glu
    290                 295                 300

Tyr Glu Asp Leu Thr Glu Ile Met Ser Asn Val Gln Leu Asn Ser Asn
305                 310                 315                 320

Phe Leu Ala Leu Ala Arg Glu Leu Asp Ile Met Glu Pro Lys Val Pro
                325                 330                 335

Asp Asp Ile Tyr Lys Thr His Leu Glu Asn Asn Arg Phe Gly Gly Ser
            340                 345                 350

Gly Ser Gln Val Asp Ser Ala Arg Met Asn Leu Ala Ser Ser Phe Val
        355                 360                 365

Asn Gly Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Gln Asp Lys Leu Leu Thr Asp
    370                 375                 380

Asp Gly Asn Lys Trp Leu Tyr Lys Asn Lys Asp His Gly Met Leu Ser
385                 390                 395                 400

Ala Ala Ala Ser Leu Gly Met Ile Leu Leu Trp Asp Val Asp Gly Gly
                405                 410                 415
```

```
Leu Thr Gln Ile Asp Lys Tyr Leu Tyr Ser Ser Glu Asp Tyr Ile Lys
            420                 425                 430

Ser Gly Ala Leu Leu Ala Cys Gly Ile Val Asn Ser Gly Val Arg Asn
        435                 440                 445

Glu Cys Asp Pro Ala Leu Ala Leu Leu Ser Asp Tyr Val Leu His Asn
    450                 455                 460

Ser Asn Thr Met Arg Leu Gly Ser Ile Phe Gly Leu Gly Leu Ala Tyr
465                 470                 475                 480

Ala Gly Ser Asn Arg Glu Asp Val Leu Thr Leu Leu Leu Pro Val Met
                485                 490                 495

Gly Asp Ser Lys Ser Ser Met Glu Val Ala Gly Val Thr Ala Leu Ala
            500                 505                 510

Cys Gly Met Ile Ala Val Gly Ser Cys Asn Gly Asp Val Thr Ser Thr
        515                 520                 525

Ile Leu Gln Thr Ile Met Glu Lys Ser Glu Thr Glu Leu Lys Asp Thr
    530                 535                 540

Tyr Ala Arg Trp Leu Pro Leu Gly Leu Gly Leu Asn His Leu Gly Lys
545                 550                 555                 560

Gly Glu Ala Ile Glu Ala Ile Leu Ala Ala Leu Glu Val Val Ser Glu
                565                 570                 575

Pro Phe Arg Ser Phe Ala Asn Thr Leu Val Asp Val Cys Ala Tyr Ala
            580                 585                 590

Gly Ser Gly Asn Val Leu Lys Val Gln Gln Leu Leu His Ile Cys Ser
        595                 600                 605

Glu His Phe Asp Ser Lys Glu Lys Glu Glu Asp Lys Asp Lys Lys Glu
    610                 615                 620

Lys Lys Asp Lys Asp Lys Lys Glu Ala Pro Ala Asp Met Gly Ala His
625                 630                 635                 640

Gln Gly Val Ala Val Leu Gly Ile Ala Leu Ile Ala Met Gly Glu Glu
                645                 650                 655

Ile Gly Ala Glu Met Ala Leu Arg Thr Phe Gly His Leu Leu Arg Tyr
            660                 665                 670

Gly Glu Pro Thr Leu Arg Arg Ala Val Pro Leu Ala Leu Ala Leu Ile
        675                 680                 685

Ser Val Ser Asn Pro Arg Leu Asn Ile Leu Asp Thr Leu Ser Lys Phe
    690                 695                 700

Ser His Asp Ala Asp Pro Glu Val Ser Tyr Asn Ser Ile Phe Ala Met
705                 710                 715                 720

Gly Met Val Gly Ser Gly Thr Asn Asn Ala Arg Leu Ala Ala Met Leu
                725                 730                 735

Arg Gln Leu Ala Gln Tyr His Ala Lys Asp Pro Asn Asn Leu Phe Met
            740                 745                 750

Val Arg Leu Ala Gln Gly Leu Thr His Leu Gly Lys Gly Thr Leu Thr
        755                 760                 765
```

```
Leu Cys Pro Tyr His Ser Asp Arg Gln Leu Met Ser Gln Val Ala Val
    770                 775                 780

Ala Gly Leu Leu Thr Val Leu Val Ser Phe Leu Asp Val Arg Asn Ile
785                 790                 795                 800

Ile Leu Gly Lys Ser His Tyr Val Leu Tyr Gly Leu Val Ala Ala Met
                805                 810                 815

Gln Pro Arg Met Leu Val Thr Phe Asp Glu Glu Leu Arg Pro Leu Pro
            820                 825                 830

Val Ser Val Arg Val Gly Gln Ala Val Asp Val Val Gly Gln Ala Gly
        835                 840                 845

Lys Pro Lys Thr Ile Thr Gly Phe Gln Thr His Thr Thr Pro Val Leu
    850                 855                 860

Leu Ala His Gly Glu Arg Ala Glu Leu Ala Thr Glu Glu Phe Leu Pro
865                 870                 875                 880

Val Thr Pro Ile Leu Glu Gly Phe Val Ile Phe Gly Arg Thr Pro Ile
                885                 890                 895

Met Ile Ser Lys
            900
```

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 15:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 995 aminosyrer

(B) TYPE: Aminosyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: Protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 15:

```
Lys Lys Met Val Asp Glu Ser Asp Lys Lys Gln Gln Thr Ile Asp Glu
1               5                   10                  15

Gln Ser Gln Ile Ser Pro Glu Lys Gln Thr Pro Asn Lys Lys Asp Lys
            20                  25                  30

Lys Lys Glu Glu Glu Glu Gln Leu Ser Glu Glu Asp Ala Lys Leu Lys
        35                  40                  45

Thr Asp Leu Glu Leu Leu Val Glu Arg Leu Lys Glu Asp Asp Ser Ser
    50                  55                  60

Leu Tyr Glu Ala Ser Leu Asn Ala Leu Lys Glu Ser Ile Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

Thr Ser Ser Met Thr Ala Val Pro Lys Pro Leu Lys Phe Leu Arg Pro
                85                  90                  95

Thr Tyr Pro Asp Leu Cys Ser Ile Tyr Asp Lys Trp Thr Asp Pro Asn
            100                 105                 110

Leu Lys Ser Ser Leu Ala Asp Val Leu Ser Ile Leu Ala Met Thr Tyr
        115                 120                 125

Ser Glu Asn Gly Lys His Asp Ser Leu Arg Tyr Arg Leu Leu Ser Asp
    130                 135                 140
```

```
Val Ser Asp Phe Glu Gly Trp Gly His Glu Tyr Ile Arg His Leu Ala
145                 150                 155                 160

Leu Glu Ile Gly Glu Val Tyr Asn Asp Gln Val Glu Lys Asp Ala Glu
                165                 170                 175

Asp Glu Thr Ser Ser Asp Gly Ser Lys Ser Asp Gly Ser Ala Ala Thr
            180                 185                 190

Ser Gly Phe Glu Phe Ser Lys Glu Asp Thr Leu Arg Leu Cys Leu Asp
        195                 200                 205

Ile Val Pro Tyr Phe Leu Lys His Asn Gly Glu Glu Asp Ala Val Asp
    210                 215                 220

Leu Leu Leu Glu Ile Glu Ser Ile Asp Lys Leu Pro Gln Phe Val Asp
225                 230                 235                 240

Glu Asn Thr Phe Gln Arg Val Cys Gln Tyr Met Val Ala Cys Val Pro
                245                 250                 255

Leu Leu Pro Pro Pro Glu Asp Val Ala Phe Leu Lys Thr Ala Tyr Ser
            260                 265                 270

Ile Tyr Leu Ser Gln Asn Glu Leu Thr Asp Ala Ile Ala Leu Ala Val
        275                 280                 285

Arg Leu Gly Glu Glu Asp Met Ile Arg Ser Val Phe Asp Ala Thr Ser
    290                 295                 300

Asp Pro Val Met His Lys Gln Leu Ala Tyr Ile Leu Ala Ala Gln Lys
305                 310                 315                 320

Thr Ser Phe Glu Tyr Glu Gly Val Gln Asp Ile Ile Gly Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Leu Ser Glu His Phe Leu Tyr Leu Ala Lys Glu Leu Asn Leu Thr Gly
            340                 345                 350

Pro Lys Val Pro Glu Asp Ile Tyr Lys Ser His Leu Asp Asn Ser Lys
        355                 360                 365

Ser Val Phe Ser Ser Ala Gly Leu Asp Ser Ala Gln Gln Asn Leu Ala
    370                 375                 380

Ser Ser Phe Val Asn Gly Phe Leu Asn Leu Gly Tyr Cys Asn Asp Lys
385                 390                 395                 400

Leu Ile Val Asp Asn Asp Asn Trp Val Tyr Lys Thr Lys Gly Asp Gly
                405                 410                 415

Met Thr Ser Ala Val Ala Ser Ile Gly Ser Ile Tyr Gln Trp Asn Leu
            420                 425                 430

Asp Gly Leu Gln Gln Leu Asp Lys Tyr Leu Tyr Val Asp Glu Pro Glu
        435                 440                 445

Val Lys Ala Gly Ala Leu Leu Gly Ile Gly Ile Ser Ala Ser Gly Val
    450                 455                 460

His Asp Gly Glu Val Glu Pro Ala Leu Leu Leu Leu Gln Asp Tyr Val
465                 470                 475                 480

Thr Asn Pro Asp Thr Lys Ile Ser Ser Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly
                485                 490                 495
```

Ile Ala Phe Ala Gly Ser Lys Asn Asp Glu Val Leu Gly Leu Leu Leu
500 505 510

Pro Ile Ala Ala Ser Thr Asp Leu Pro Ile Glu Thr Ala Ala Met Ala
515 520 525

Ser Leu Ala Leu Ala His Val Phe Val Gly Thr Cys Asn Gly Asp Ile
530 535 540

Thr Thr Ser Ile Met Asp Asn Phe Leu Glu Arg Thr Ala Ile Glu Leu
545 550 555 560

Lys Thr Asp Trp Val Arg Phe Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Tyr
565 570 575

Met Gly Gln Gly Glu Gln Val Asp Asp Val Leu Glu Thr Ile Ser Ala
580 585 590

Ile Glu His Pro Met Thr Ser Ala Ile Glu Val Leu Val Gly Ser Cys
595 600 605

Ala Tyr Thr Gly Thr Gly Asp Val Leu Leu Ile Gln Asp Leu Leu His
610 615 620

Arg Leu Thr Pro Lys Asn Val Lys Gly Glu Glu Asp Ala Asp Glu Glu
625 630 635 640

Glu Thr Ala Glu Gly Gln Thr Asn Ser Ile Ser Asp Phe Leu Gly Glu
645 650 655

Gln Val Asn Glu Pro Thr Lys Asn Glu Glu Ala Glu Ile Glu Val Asp
660 665 670

Glu Met Glu Val Asp Ala Glu Gly Glu Glu Val Glu Val Lys Ala Glu
675 680 685

Ile Thr Glu Lys Lys Asn Gly Glu Ser Leu Glu Gly Glu Glu Ile Lys
690 695 700

Ser Glu Glu Lys Lys Gly Lys Ser Ser Asp Lys Asp Ala Thr Thr Asp
705 710 715 720

Gly Lys Asn Asp Asp Glu Glu Glu Glu Lys Glu Ala Gly Ile Val Asp
725 730 735

Glu Leu Ala Tyr Ala Val Leu Gly Ile Ala Leu Ile Ala Leu Gly Glu
740 745 750

Asp Ile Gly Lys Glu Met Ser Leu Arg His Phe Gly His Leu Met His
755 760 765

Tyr Gly Asn Glu His Ile Arg Arg Met Val Pro Leu Ala Met Gly Ile
770 775 780

Val Ser Val Ser Asp Pro Gln Met Lys Val Phe Asp Thr Leu Thr Arg
785 790 795 800

Phe Ser His Asp Ala Asp Leu Glu Val Ser Met Asn Ser Ile Phe Ala
805 810 815

Met Gly Leu Cys Gly Ala Gly Thr Asn Asn Ala Arg Leu Ala Gln Leu
820 825 830

Leu Arg Gln Leu Ala Ser Tyr Tyr Ser Arg Glu Gln Asp Ala Leu Phe
835 840 845

```
Ile Thr Arg Leu Ala Gln Gly Leu Leu His Leu Gly Lys Gly Thr Met
    850                 855                 860

Thr Met Asp Val Phe Asn Asp Ala His Val Leu Asn Lys Val Thr Leu
865                 870                 875                 880

Ala Ser Ile Leu Thr Thr Ala Val Gly Leu Val Ser Pro Ser Phe Met
                885                 890                 895

Leu Lys His His Gln Leu Phe Tyr Met Leu Asn Ala Gly Ile Arg Pro
            900                 905                 910

Lys Phe Ile Leu Ala Leu Asn Asp Glu Gly Glu Pro Ile Lys Val Asn
        915                 920                 925

Val Arg Val Gly Gln Ala Val Glu Thr Val Gly Gln Ala Gly Arg Pro
    930                 935                 940

Lys Lys Ile Thr Gly Trp Ile Thr Gln Ser Thr Pro Val Leu Leu Asn
945                 950                 955                 960

His Gly Glu Arg Ala Glu Leu Glu Thr Asp Glu Tyr Ile Ser Tyr Thr
                965                 970                 975

Ser His Ile Glu Gly Val Val Ile Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Arg
            980                 985                 990

Glu Glu Glu
        995
```

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 16:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 945 aminosyrer

(B) TYPE: Aminosyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: Protein

(xi) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

```
Met Ser Leu Thr Thr Ala Ala Pro Leu Leu Ala Leu Leu Arg Glu Asn
1               5                   10                  15

Gln Asp Ser Val Lys Thr Tyr Ala Leu Glu Ser Ile Asn Asn Val Val
            20                  25                  30

Asp Gln Leu Trp Ser Glu Ile Ser Asn Glu Leu Pro Asp Ile Glu Ala
        35                  40                  45

Leu Tyr Asp Asp Asp Thr Phe Ser Asp Arg Glu Met Ala Ala Leu Ile
    50                  55                  60

Ala Ser Lys Val Tyr Tyr Asn Leu Gly Glu Tyr Glu Ser Ala Val Lys
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Leu Ala Ala Lys Asp Arg Phe Asp Ile Asp Glu Lys Ser Gln
                85                  90                  95

Phe Val Glu Thr Ile Val Ser Lys Ser Ile Glu Met Tyr Val Gln Glu
            100                 105                 110

Ala Ser Lys Gln Tyr Thr Lys Asp Glu Gln Phe Tyr Thr Lys Asp Ile
        115                 120                 125
```

```
Ile Asp Pro Lys Leu Thr Ser Ile Phe Glu Arg Met Ile Glu Lys Cys
    130                 135                 140

Leu Lys Ala Ser Glu Leu Lys Leu Ala Leu Gly Ile Ala Leu Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Leu Asp Ile Ile Glu Ser Ala Leu Lys Ser Lys Leu Asp Gln
                165                 170                 175

Asp Ser Thr Ser Glu Asn Val Lys Ile Ile Asn Tyr Leu Leu Thr Leu
            180                 185                 190

Ala Ile Thr Thr Val Thr Asn Ser Lys Phe Arg Ser Ser Ile Leu Arg
        195                 200                 205

Lys Ser Phe Asp Phe Leu Met Asn Met Pro Asn Cys Asp Tyr Leu Thr
    210                 215                 220

Leu Asn Lys Val Val Val Asn Leu Asn Asp Ala Gly Leu Ala Leu Gln
225                 230                 235                 240

Leu Phe Lys Lys Leu Lys Glu Glu Asn Asp Glu Gly Leu Ser Ala Gln
                245                 250                 255

Ile Ala Phe Asp Leu Val Ser Ser Ala Ser Gln Gln Leu Leu Glu Ile
            260                 265                 270

Leu Val Thr Glu Leu Thr Ala Gln Gly Tyr Asp Pro Ala Leu Leu Asn
        275                 280                 285

Ile Leu Ser Gly Leu Pro Thr Cys Asp Tyr Tyr Asn Thr Phe Leu Leu
    290                 295                 300

Asn Asn Lys Asn Ile Asp Ile Gly Leu Leu Asn Lys Ser Lys Ser Ser
305                 310                 315                 320

Leu Asp Gly Lys Phe Ser Leu Phe His Thr Ala Val Arg Leu Ala Asn
                325                 330                 335

Gly Phe Met His Ala Gly Thr Thr Asp Asn Ser Phe Ile Lys Ala Asn
            340                 345                 350

Leu Pro Trp Leu Gly Lys Ala Gln Asn Trp Ala Lys Phe Thr Ala Thr
        355                 360                 365

Ala Ser Leu Gly Val Ile His Lys Gly Asn Leu Leu Glu Gly Lys Lys
    370                 375                 380

Val Met Ala Pro Tyr Leu Pro Gly Ser Arg Ala Ser Ser Arg Phe Ile
385                 390                 395                 400

Lys Gly Gly Ser Leu Tyr Gly Leu Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Phe Gly
                405                 410                 415

Arg Asp Thr Thr Asp Tyr Leu Lys Asn Ile Ile Val Glu Asn Ser Gly
            420                 425                 430

Thr Ser Gly Asp Glu Asp Val Asp Val Leu Leu His Gly Ala Ser Leu
        435                 440                 445

Gly Ile Gly Leu Ala Ala Met Gly Ser Ala Asn Ile Glu Val Tyr Glu
    450                 455                 460

Ala Leu Lys Glu Val Leu Tyr Asn Asp Ser Ala Thr Ser Gly Glu Ala
465                 470                 475                 480
```

Ala Ala Leu Gly Met Gly Leu Cys Met Leu Gly Thr Gly Lys Pro Glu
485 490 495

Ala Ile His Asp Met Phe Thr Tyr Ser Gln Glu Thr Gln His Gly Asn
500 505 510

Ile Thr Arg Gly Leu Ala Val Gly Leu Ala Leu Ile Asn Tyr Gly Arg
515 520 525

Gln Glu Leu Ala Asp Asp Leu Ile Thr Lys Met Leu Ala Ser Asp Glu
530 535 540

Ser Leu Leu Arg Tyr Gly Gly Ala Phe Thr Ile Ala Leu Ala Tyr Ala
545 550 555 560

Gly Thr Gly Asn Asn Ser Ala Val Lys Arg Leu Leu His Val Ala Val
565 570 575

Ser Asp Ser Asn Asp Asp Val Arg Arg Ala Ala Val Ile Ala Leu Gly
580 585 590

Phe Val Leu Leu Arg Asp Tyr Thr Thr Val Pro Arg Ile Val Gln Leu
595 600 605

Leu Ser Lys Ser His Asn Ala His Val Arg Cys Gly Thr Ala Phe Ala
610 615 620

Leu Gly Ile Ala Cys Ala Gly Lys Gly Leu Gln Ser Ala Ile Asp Val
625 630 635 640

Leu Asp Pro Leu Thr Lys Asp Pro Val Asp Phe Val Arg Gln Ala Ala
645 650 655

Met Ile Ala Leu Ser Met Ile Leu Ile Gln Gln Thr Glu Lys Leu Asn
660 665 670

Pro Gln Val Ala Asp Ile Asn Lys Asn Phe Leu Ser Val Ile Thr Asn
675 680 685

Lys His Gln Glu Gly Leu Ala Lys Phe Gly Ala Cys Val Ala Gln Gly
690 695 700

Ile Met Asn Ala Gly Gly Arg Asn Val Thr Ile Gln Leu Glu Asn Ala
705 710 715 720

Asp Thr Gly Thr Leu Asp Thr Lys Ser Val Val Gly Leu Val Met Phe
725 730 735

Ser Gln Phe Trp Tyr Trp Phe Pro Leu Ala His Phe Leu Ser Leu Ser
740 745 750

Phe Thr Pro Thr Thr Val Ile Gly Ile Arg Gly Ser Asp Gln Ala Ile
755 760 765

Pro Lys Phe Gln Met Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Asp Ala Phe Ser Tyr
770 775 780

Pro Arg Met Tyr Glu Glu Ala Ser Gly Lys Glu Val Glu Lys Val Ala
785 790 795 800

Thr Ala Val Leu Ser Thr Thr Ala Arg Ala Lys Ala Arg Ala Lys Lys
805 810 815

Thr Lys Lys Glu Lys Gly Pro Asn Glu Glu Glu Lys Lys Lys Glu His
820 825 830

```
Glu Glu Lys Glu Lys Glu Arg Glu Thr Asn Lys Lys Gly Ile Lys Glu
        835                 840                 845

Thr Lys Glu Asn Asp Glu Glu Phe Tyr Lys Asn Lys Tyr Ser Ser Lys
    850                 855                 860

Pro Tyr Lys Val Asp Asn Met Thr Arg Ile Leu Pro Gln Gln Ser Arg
865                 870                 875                 880

Tyr Ile Ser Phe Ile Lys Asp Asp Arg Phe Val Pro Val Arg Lys Phe
                885                 890                 895

Lys Gly Asn Asn Gly Val Val Val Leu Arg Asp Arg Glu Pro Lys Glu
            900                 905                 910

Pro Val Ala Leu Ile Glu Thr Val Arg Gln Met Lys Asp Val Asn Ala
        915                 920                 925

Pro Leu Pro Thr Pro Phe Lys Val Asp Asp Asn Val Asp Phe Pro Ser
    930                 935                 940

Ala
945
```

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 17:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 142 aminosyrer

(B) TYPE: Aminosyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: Peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 17:

```
Trp Xaa Ile Arg Ser Asp Glu Arg Val Leu Gln Tyr Gly Glu Gln Asn
1               5                  10                  15

Ile Arg Arg Ala Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Leu Cys Ile Ser Asn
            20                  25                  30

Pro Lys Val Thr Val Met Asp Thr Leu Ser Arg Leu Ser His Asp Arg
        35                  40                  45

Phe Arg Ser Cys Asn Gly Ser Asn Tyr Leu Pro Trp Ile Asp Arg Arg
    50                  55                  60

Trp Asn Gln Gln Cys Lys Asp Ser Trp His Ala Lys Ser Leu Gln Leu
65                  70                  75                  80

Leu Leu Gln Gly Cys Pro Xaa Phe Phe Ser Val Cys Ala Ser Leu Lys
                85                  90                  95

Gly Phe Xaa His Met Gly Lys Gly Leu Leu Thr Leu Asn Pro Phe His
            100                 105                 110

Ser Glu Arg Ala Xaa Phe Leu Xaa Xaa Asn Pro Asp Phe Pro Trp Val
        115                 120                 125

Gly Xaa Asn Phe Leu Gln Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Ile Glu Thr
    130                 135                 140
```

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 97 aminosyrer

(B) TYPE: Aminosyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGY: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: Peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO:18:

```
Met Gln Pro Arg Met Leu Thr Thr Leu Val Glu Asp Glu Met Lys Pro
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Lys Gln Leu Asn Val Ser Val Arg Val Gly Gln Pro Val
            20                  25                  30

Asp Val Val Ala Gln Ala Gly Lys Pro Lys Thr Ile Thr Gly Phe Gln
        35                  40                  45

Thr His Thr Thr Pro Val Leu Leu Ala His Gly Glu Arg Ala Glu Leu
    50                  55                  60

Ala Asn Asp Glu Tyr Leu Ser Val Thr Pro His Leu Glu Gly Leu Val
65                  70                  75                  80

Ile Leu Lys Lys Asn Pro Asp Tyr Gln Pro Val Val Val Ser Thr Lys
                85                  90                  95

Lys
```

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 19:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 390 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 19:

```
ATCAGTGTCA CTACGGATAG TGATGACACT CACAGGAGGG CTGGGGGTAT CTGGAATGAT      60

GATTGGCTGA TGCTGGTCTT GGACAGGAAC TAGGGAATTA TAAGAAGATG TGGTACGAAG     120

AGGACTACTC CCANCCAGAG AATAAACTTG AGAAGGCAGG ACTTCCAGAG AGGATTTGGA     180

TGAAACTGGA GCAGACTGCT TATTCTACTT TGAAGGGAGG GAACTAGACT GTTGTTGTCT     240

GACAACATGG GCAACACCAA CATTCAGAGG CTGAGCAGTN GCCAAGGNCA CATGGTTGGT     300

CAGCAAAGAT GGCTGCTGCA TAATAGTGCT GTACTGGTCG NCATGAGAGT GGGCATTCCC     360

CAGTCAGCTA GCTGGTGGGC TGCTCCCCAT                                      390
```

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 385 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 20:

```
CCTCTCAGTT ATCTCTGTTG GAGTAGTCCT CTTCGTACCA CATCTTCTTA TAATTCCCTA      60
GTTCCTGTCC AAGACCAGCA TCAGCCAATC ATCATTCCAG ATACCCCCAG CCCTCCTGTG     120
AGTGTCATCA CTATCCGTAG TGACACTGAT GAAGAAGAGG ACAACAAATA CAAGCCCAAT     180
AGCTCGAGCC TGAAGGCGAG GTCTAATGTC ATCAGTTATG TCACTGTCAA TGATTCTCCA     240
GACTCTGACT CCTCCCTGAG CAGCCCACAT TCCACAGCCA CTCTGAGTGC TCTGCGGGGC     300
AACAGTGGGA CCCTTCTGGA GGGACCTGGC AGACCTGCAG CAGATGGCAT TGGCACCCGT     360
ACTATCATTG TACCTGAGCG GCCGC                                           385
```

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 21:
(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:
(A) LENGDE: 444 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI: Lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ NO: 21:

```
GGGAGCCTGT GCACCCCGAT GTCACCATGA AGCCACTGCC CTTCTATGAA GTCTATGGGG      60
AGCTCATCCG ACCCACCACC CTTGCGTCCA CCTCCAGCCA GAGGTTCGAG GAAGCCCACT     120
TCACCTTCGC GCTCACTCCC CAGCAGCTGC AGCAGATTCT CACGTCCAGG GAGGTTATGC     180
CAGGAGCCAA GTGTGATTAC ACCATACAAG TGCAGCTCAG ATTCTGTCTC TGTGAGACCA     240
GCTGCCCTCA GGAGGACTAT TTCCCCCCTA ACCTCTTTGT TAAGGTTAAT GGGAAACTCT     300
GCCCCCTGCC GGGTTACCTC CCTCCAACCC AAGAATGGAG CTGAGCCCAA GAGGCCCAGC     360
CGTCCGATCA ACATCACACC CTTGGCTCGA CTCTCAGCCA CTGTCCCCAA CACCATCGTA     420
GTTAATTGGG TCATCTTGAA GTTT                                            444
```

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 22:
(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:
(A) LENGDE: 888 basepar
(B) TYPE: Nukleinsyre
(C) BESKAFFENHET: Enkel
(D) TOPOLOGI; Lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA
(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 22:

```
TCCAACACCA TCGTAGATAA ATTGGTCATC TGAGTTTGGA CCGGAATTAC TCCTTGTCCG      60
TGTACCCTGG TGAGGCAATT GACTGCAGGG ACCCTTCTAC ACAAACTCAG AGCCAAGGGG     120
ATCCGGAATC CAGACCATTC CCGGGCACTG ATCAAGGAGA AACTGACTGC TGACCCCGAC     180
```

AGTGAAGTGG CTACTACAAG TCTCCGGGTG TCACTCATGT GCCCGCTAGG GAAGATGCGC 240

CTGACTGTCC CGTGTCGTGC CCTCACCTGT GCCCATCTGC AGAGTTTCGA TGCTGCCCTT 300

TATCTACAGA TGAATGAGAA GAAGCCGACA TGGACGTGTC CTGTGCGTGA CAAGAAGGCT 360

CCCTATGAGT CGCTGATTAT TGATGGTTTA TTCATGGAAA TTCTTAATTC CTGTTCGGAT 420

TGTGATGAGA TCCAGTTCAT GGAAGATGGA TCCTGGTGTC CGATGAAACC CAAGAAGGAG 480

GCATCAGAGG TTTGCCCCCC GCCAGGGTAT GGGCTGGATG GTCTCCAGTA CAGCGCAGTC 540

CAGGAGGGAA TTCAGCCAGA GAGTAAGAAG AGGGTCGAAG TCATTGACTT GACCATCGAA 600

AGCTCATCAG ATGAGGAGGA TTTGCCCCCC ACCAAGAAGC ACTGCCCTGT CACCTCAGCG 660

GTCATTCCAG CCCTTCCTGG AAGCAAAGGA GCCCTGACCT CTGGTCACCA GCCATCCTCG 720

GTGCTGCGGA GCCCTGCAAT GGGCACACTG GGCAGTGACT TCCTGTCTAG TCTCCCGCTA 780

CATGAGTACC CACCTGCCTT CCCACTGGGG GTTGACATCC AAGGTTTAGA TTTTATTTTC 840

TTTTCTTCAG ACTGAGAGTC AGAATTACGG GCCTTCAGTT ATCATTCG 888

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 23:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 392 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 23:

CCACTTCCTG GCCCACTGCC CCCAAACTGG GGACTCTCAC CGCAAGCTCC AACTCCAGCG 60

CCCCCTCCTG GTCGTGTCAG CAGCATTGTG GCTCCTGGGA GCTCCTTGAG GGAAGGGCAT 120

GGAGGACCCC TGCCTTCAGG TCCCTCTTTG ACTGGCTGTC GGTCAGACGT CATTTCCTTG 180

GACTGAGCTT TTTGGATTAT GAAATCAATC TCCATTGGCC CCAGCACTGA GCAGATCACG 240

TTGTGGGTTC CGAACCCCTG GCTGCTCTGA TCCCTCAGGG GTCATTGGCC AAAGGCCAGG 300

CCAGAGCTTC ATGGATACCT GCTTTTGGCC TTATCGCTGC CTAACAGGCC AGTACTCACA 360

GGGTTAACAT TTAACCTTTT TATGGTGGCC CG 392

(2) **INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 24:**

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKKER:

(A) LENGDE: 425 basepar

(B) TYPE: Nukleinsyre

(C) BESKAFFENHET: Enkel

(D) TOPOLOGI: Lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 24:

AATTCGGCAC GAGGTTGTGC TGTGGGGAAG GGAGAAGGAT TTGTAAACCC CGGAGCGAGG 60

TTCTGCTTAC CCGAGGCCGC TGCTGTGCGG AGACCCCCGG GTGAAGCCAC CGTCATCATG 120

TCTGACCAGG AGGCAAAACC TTCCAACTGA GGACTTGGGG GATAAGAAGG AAGGTGAATA 120

TATTAAACTC AAAGTCATTG GACAGGATAG CAGTGAGATT CACTTCAAAG TGAAAATGAC 240

AACACATCTC AAGAAACTCA AAGAATCATA CTGTCAAAGA CAGGGTGTTC CAATGAATTC 300

ACTCAGGTTT CTCTTTGAGG GTCAGAGAAT TGCTGATAAT CATACTCCAA AAGAACTGGG 360

AATGGAGAAG AAAGATTGTG ATTTGAAGTT TTATCAGGAA CAAACGGGGG GTCATTCAAC 420

AGCTT 425

STØTTE FOR SEKVENSLISTINGENE I SØKNADEN

SEKVENS-ID-NR.	LOKALISERING
1	side 78 i beskrivelsen
2	side 78 i beskrivelsen
3	side 78 i beskrivelsen
4	side 78 i beskrivelsen
5	side 78 i beskrivelsen
6	side 78 i beskrivelsen
7	side 78 i beskrivelsen
8	side 78 i beskrivelsen
9	Fig. 1A
10	Fig. 1B, første del
11	Fig. 1B, andre del
12	Fig. 1C, føste del
13	Fig. 1C, andre del
14	Fig. 1D
15	Fig. 4, YHRO27c (gjær)
16	Fig. 4, SEN3 (gjær)
17	Fig. 4, A.thaliana (plante)
18	Fig. 4, C.elegans (nematode)
19	Fig. 10, første del
20	Fig. 10, andre del
21	Fig. 11, føste del
22	Fig. 11, andre del
23	Fig. 11, tredje del
24	Fig. 12

P a t e n t k r a v

1.
DNA-sekvens som koder for et protein i stand til å binde til et intracellulært domene av en reseptor tilhørende tumornekrosefaktor/nervevekstfaktor (TNF/NGF) –reseptorsuper-familien, fortrinnsvis valgt fra gruppen bestående av p55 TNF-R, p75 TNF-R og FAS-ligandreseptoren, idet nevnte DNA-sekvens velges fra gruppen bestående av:

(a) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proteinet 55.1 med aminosyresekvensen tilsvarende aminosyreresidium 328 til residium 426 i p55 TNF-R-aminosyresekvens;

(b) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proE6n 55.3 med aminosyresekvensen tilsvarende aminosyreresidium 277 til residium 426 i p55 TNF-R-aminosyresekvensen;

(c) DNA-sekvenser omfattende en nukleotidsekvens som koder for proteinet 55.11 med aminosyresekvensen gitt i figur 4;

(d) DNA-sekvenser som koder for et protein valgt fra gruppen bestående av de heri designerte proteinene 75.3 og 75.16 omfattende nukleotidsekvensen gitt henholdsvis i figur 1(b) og figur 1(c);

(e) DNA-sekvenser som koder for et hvilket som helst av proteinene F2, F9 og DD11, omfattende en DNA-sekvens valgt fra gruppen bestående av nukleotidsekvensen gitt i henholdsvis første og andre del av figur 10, nukleotidsekvensen gitt i første, andre og tredje del av figur 11 og nukleotidsekvensen gitt i figur 12;

(f) DNA-sekvenser i stand til å hybridisere til en DNA-sekvens ifølge et hvilket som helst av punktene (a) til (e) under moderat stringente betingelser, og

(g) DNA-sekvenser som er degenererte som et resultat av den genetiske koden i forhold til DNA-sekvensene ifølge hvilket som helst av punktene (a) til (f).

2.
Vektor omfattende en DNA-sekvens i henhold til krav 1.

3.
Transformert eukaryot eller prokaryot vertscelle inneholdende en vektor i henhold til krav 2.

4.
Fremgangsmåte for fremstilling av proteinet, analogene eller derivatene som er i stand til å binde til et intarcellulært domene til en reseptor tilhørende tumornekrosefaktor/-nervevekstfaktor (TNF/NGF) –reseptorsuperfamilien, omfattende dyrking av den transformerte vertscellen i henhold til krav 3 under betingelser egnet for ekspresjon av nevnte protein, analoger eller derivater, som forårsaker posttranslasjonsmodifikasjon av nevnte protein som nødvendig for oppnåelse av nevnte protein og ekstraksjon av nevnte uttrykte protein, analoger eller derivater fra kulturmediet til nevnte transformerte celle eller fra celleekstraktene fra nevnte transformerte celle.

5.
Protein, eller analoger og derivater derav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i stand til å binde til et intracellulært domene til en TNF eller FAS-reseptor kodet av en DNA-sekvens i henhold til krav 1 eller produsert i henhold til fremgangsmåten i krav 4.

6.
Anvendelse av ett eller flere proteiner, analoger eller derivater valgt fra gruppen bestående av proteinene, analogene og derivatene i henhold til krav 5 og et protein som er p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, analoger eller derivater derav, idet alle nevnte proteiner er i stand til å binde til det intracellulære domenet og modulere aktiviteten av nevnte TNF-R eller FAS-R, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler som bærer en TNF-R eller en FAS-R, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning omfatter nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form egnet for intracellulær introduksjon i celler, eller en DNA-sekvens som koder for nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i form av en egnet vektor som bærer nevnte sekvens, idet nevnte vektor er i stand til å forårsake innsetting av nevnte sekvens i nevnte celler på en slik måte at nevnte sekvens uttrykkes i nevnte celler.

7.
Anvendelse av en oligonukleotidsekvens valgt fra en sekvens som koder for en antisens-sekvens av minst en del av sekvensen i henhold til krav 1, og en sekvens som koder for

antisenssekvensen til p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, idet nevnte oligonukleotid-sekvens er i stand til å blokkere ekspresjonen av minst én av de TNF-R eller FAS-R intracellulære domenebindende proteinene for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandvirkningen på celler som bærer en TNF-R eller en FAS-R.

8.

Anvendelse av en rekombinant animalsk virusvektor som bærer en sekvens som koder for et viralt overflateprotein som er i stand til å binde til en spesifikk tumorcelle-overflatereseptor eller HIV-infisert celleoverflatereseptor eller reseptor båret av andre syke celler og en sekvens som koder for et protein, analog eller derivat ifølge krav 5, som, når uttrykt i nevnte tumorcelle, HIV-infiserte celle eller annen sykelig celle er i stand til å drepe nevnte celle, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av tumorceller eller HIV-infiserte celler eller andre sykelige celler.

9.

Anvendelse av ett eller flere proteiner, analoger eller derivater ifølge krav 5, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for induksjon av TNF-assosierte virkninger i celler eller vev, hvor nevnte farmasøytiske sammensetning som omfatter nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i en form egnet for intracellulær introduksjon i celler, eller en DNA-sekvens som koder for nevnte én eller flere proteiner, analoger eller derivater i form av en egnet vektor som bærer nevnte sekvens, idet nevnte vektor er i stand til å forårsake innsetting av nevnte sekvens i nevnte celler på en måte slik at nevnte sekvens uttrykkes i nevnte celler.

10.

Anvendelse av en vektor som koder for en ribozymsekvens i stand til interaksjon med en cellulær mRNA-sekvens som koder for et protein i henhold til krav 5 eller en mRNA-sekvens som koder for p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD til fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler utformet på en måte som tillater ekspresjon av nevnte ribozymsekvens i nevnte celler, og når nevnte ribozymsekvens uttrykkes i nevnte celler interagerer den med nevnte cellulære mRNA-sekvens og kutter nevnte mRNA-sekvens, resulterende i ekspresjonsinhibering av nevnte protein eller nevnte p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD i nevnte celler.

11.

Fremgangsmåte for isolering og identifisering av proteiner i stand til å binde de intracellulære domenebindende proteinene i henhold til krav 5, omfattende anvendelse av gjær-to-hybridprosedyre hvor en sekvens som koder for nevnte intracellulære domenebindende protein bæres av én hybridvektor og sekvens fra et cDNA eller genomisk DNA-bibliotek bæres av den andre hybride vektoren, vektorene anvendes så til å transformere gjærvertsceller og de positivt transformerte cellene isoleres, fulgt av ekstraksjon av nevnte andre hybride vektor for å oppnå en sekvens som koder for et protein som binder til nevnte intracellulære domenebindende protein.

12.

Farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandeffekten på celler omfattende et protein i henhold til krav 5 eller proteinet p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, dets biologisk aktive fragmenter, analoger, derivater eller blandinger derav.

13.

Farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF- eller FAS-R-ligandvirkningen på celler omfattende en rekombinant animalsk virusvektor som koder for et protein i stand til å binde en celleoverflatereseptor og som koder for et protein i henhold til krav 5, eller proteinet p55IC, p55DD, FAS-IC eller FAS-DD, dets biologisk aktive fragmenter eller analoger.

14.

Farmasøytisk sammensetning for modulering av TNF eller FAS-R-ligandvirkningen på celler omfattende en oligonukleotidsekvens som koder for en antisenssekvens ifølge sekvensen i henhold til krav 1.

15.

Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 12 for behandling av celler ved induksjon deri av TNF-assosierte virkninger, omfattende p55-IC, deler derav, analoger og derivater derav og en farmasøytisk akseptabel bærer.

16.

Anvendelse av et protein ifølge krav 5 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning, for behandling av tumorer.

55.11 klone

FIGUR 1a

(b) 75.3

5'GAATTCGGCACGAGCGGCACGAGGACAGAGTGAGACTCTGTCTCTTAAAATAATAATA
AAAATAAAAATAAAATGTGGGGCCGGGCAAGGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACCTT
GGGAGGCTGAGGCAGGAGGATTGCCTAAGCCCAGGAGTTTGACATCAGCCTGGGCAACAT
GGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATGCAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGGTGTGCTCCT
ATAGTCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTAGAGGGGATCACCTGAGCCCAGGAAGTTTGG
AGGCTATAGTGAGCTGAAGACCCGCACCATTGCACGCCAGCCTGGAGCAAGAGACNCTGT
CTCCACATAAATAAATAAATAAATAAAAGTGGGGAACTTCTGTGTTAAGTCAGAAGGCAC
CACACAATTTGNATAGCCANCAACCATATTCAATACCCAATCTCTTTATTGCAATATAAG
TATTTGTAAACCCCTACACAAATATTCCCAAGAATAAGTTGGAATATAAATTACTATATC
AATCANCCAATAAAAATAAACACATACAGTATTTATTCCTGTTGCTCCATATAAAGCTT
TGCTATTTCAATATAAAGCTTACCTAGTATGGTCATTTGAGCCTGAGCAGAGAATATGCC
CAAGCTCGTGCCGAATTC....GGCGNTCTGACTCTCTACTGAACCAAGACTGAATCAGA
GAGACTCGAGTGCNCTTATTTGATTAANCCCAAATTATTGAAACCTNTGATTTTTTCTGG
AGGNGGATGATAAAGATGTGAAAGTGTGATGAACAGTGTGTATCCCTACTCTTGATCCTG
GAACCAGACAAGCAAGAAGCTTTGATTGAAAGCCTATGTGAAAAGCTGGTCAAATTTCGC
GAAGGTGAACGCCCGTCTCTGAGACTGCAGTTGTTAAGCAACCTTTTCCACGGGATGGAT
AAGAATACTCCTGTAAGATACACAGTGTATTGCAGCCTTATTAAAGTGGCAGCATCTTGT
GGGGCCATCCAGTACATCCCAACTGAGCTGGATCAAGTTAGAAAATGGATTTCTGACTGG
AATCTCACCACTGAAAAAAAGCACACCCTTTTAAGACTACTTTATGAGGCACTTGTGGAT
TGTAAGAAGAGTGATGCTGCTTCAAAAGTCATGGTGGAATTGCTCGGAAGTTACACAGAG
GACAATGCTTCCCAGGCTCGAGTTGATGCCCACAGGTGTATTGTACGAGCATTGAAAGAT
CCAAATGCATTTCTTTGTGACCACCTTCTTACTTTAAAACCAGTCAAGTTTGTGGAAGGC
GAGCTTATTCATGATCTTTTAACCATTTGTGTGAGTGCTAAATTGGCATCATATGTCAAG
TTTTATCAGAATAATAAAGACTTCATTGATTCACTTGGCCTGTTACATGAACAGAATATG
GCAAAAATGAGACTACTTACTTTTATGGGAATGGCAGTAGAAAATAAGGAAATTTCTTTT
GACACAATGCAGCAAGAACTTCAGATTGGAGCTGATGATGTTGAAGCATTTGTTATTGAC
GCCGTAAGAACTAAAATGGTCTACTGCAAAATTGATCAGACCCAGAGAAAAGTAGTTGTC
AGTCATAGCACACATCGGACATTTGGAAAACAGCAGTGGCAACAACTGTATGACACACTT
AATGCCTGGAAACAAAATCTGAACAAAGTGAAAAACAGCCTTTTGAGTCTTTCTGATACC
TGAGTTTTTATGCTTATAATTTTTGTTCTTTGAAAAAAAAGCCCTAAATCATAGTAAAAC
ATTATAAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAG 3'

FIGUR. 1b

(c) 75.16

5'GTCCGGTTTACTTTAACTTAGTTTTGCATAGTTCTAGTGCACGTGAAATTGAAAAGTTA
TTTCCCTTTAGCTGTGTTATTATAGAGCAGAAATTCTGTTTTTAAAAATTAGCCTAAGATA
TACTTGTTTTTGTAAAGAAAAATATTTAATGCTTGAACAAAATAAATTGGAGTTGGAGTAG
AATGTAGTTTGAGGAAATTTGCAGCTTCCAATGCCTCTG.....CAGAGGCATTGGAAGCT
GCAAATTTCCTCAAACTACATTCTACTCCAACTCCAATTTATTTTGTTCAAGCATTAAATA
TTTTTCTTTACAAAAACAAGTATATCTTAGGCTAATTTTTAAAAACAGAATTTCTGCTCTA
TAATAACACAGCTAAAGGGAAATAACTTTTCAATTTCACGTGCACTAGAACTATGCAAAAC
TAAGTTAAAGTAAACCGGAC 3'

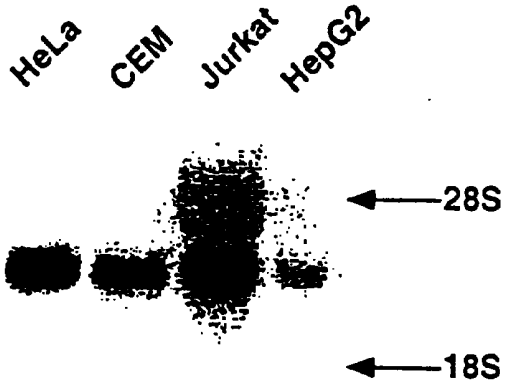
FIGUR 1c

55.11pep lengde: 900 mars 10, 1995 19:08 Type: P kontroll:9498 ..

```
   1  RVQPQQSPAA APGGTDEKPS GKERRDAGDK DKEQELSEED KQLQDEIEML
  51  VERLGEKDTS LYRPALEELR RQIRSSTTSM TSVPKPLKFL CPHYGKLKEI
 101  YENMAPGENK RFAADIISVL AMTMSGEREC LKYRLVGSQE ELASWGHEYV
 151  RHLAGEVAKE WQELDDAEKV QREPLLTLVK EIVPYNMAHN AEHEACDLIM
 201  EIEQVDMLEK DIDENAYAKV CLYLTSCVNY VPEPENSALL RCALGVFRKF
 251  TRFPEALRLA LMLNDMELVE DIFTSCKDVV VQKQMAFMLG RHGVFLELSE
 301  DVEEYEDL*TE IMSNVQHNSN FLALARELDI MEPKVPDDIY KTHLENNRFG
 351  GSCSQVDSAR MNLASSFGNG WGNAAFGQDK LLTDDGNKWL YKNKDHGMLS
 401  AAASLGMILL WDVDGGLTQI DKYLYSSEDY IKSGALLACG IVNSGVRNEC
 451  DPALALLSDY VLHNSNTMRL GSIEGLGLAY AGSNREDVLT LLLPVMGDSK
 501  SSMEVAGVTA LACGMIAVGS CNGDVTSTIL QTIMEKSETE LKDTYARWLP
 551  LGLGLNHLGK GEALEALLAA LEVVSEDFRS FGNTLVDVCA YAGSGNVLKV
 601  QQLLHICSEH FDSKEKEEDK DKKEKKDKDK KEAPADMGAH QGVAVLGIAL
 651  IAMGEEIGAE MALRTFGHLL RYGEPTLRRA VPLALALISV SNPRLNILDT
 701  LSKFSHDADP EVSYNSIFAM GMVGSGTNNA RLAAMLRQLA QYHAKDPNNL
 751  FMVRLAQGLT HLGKGTLTLC PYHSDRQLMS QVAVAGLLTV LVSFLDVRNI
 801  ILGKSHYVLY GLVAAMQPRM LVTFDEELRP LPVSVRVGQA VDVVGQAGKP
 851  KTITGFQTHT TPVLLAHGER AELATEEFLP VTPILEGFVI FGRTPIMISK
```

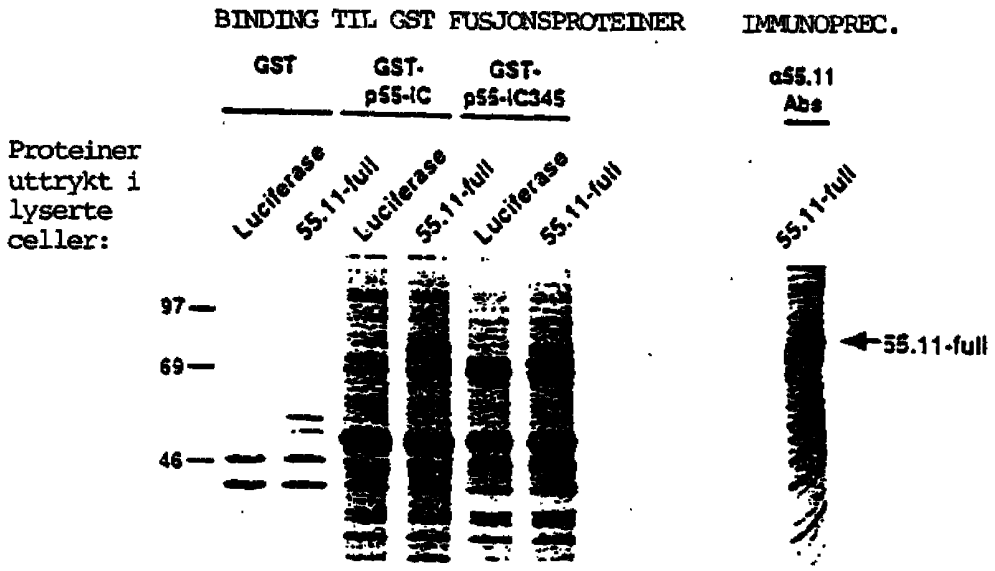
Understreket: Homologi til SEN3
UTHEVET: Basisk cluster, nukleært lokaliseringssignal
* ende av hode

FIGUR 1d

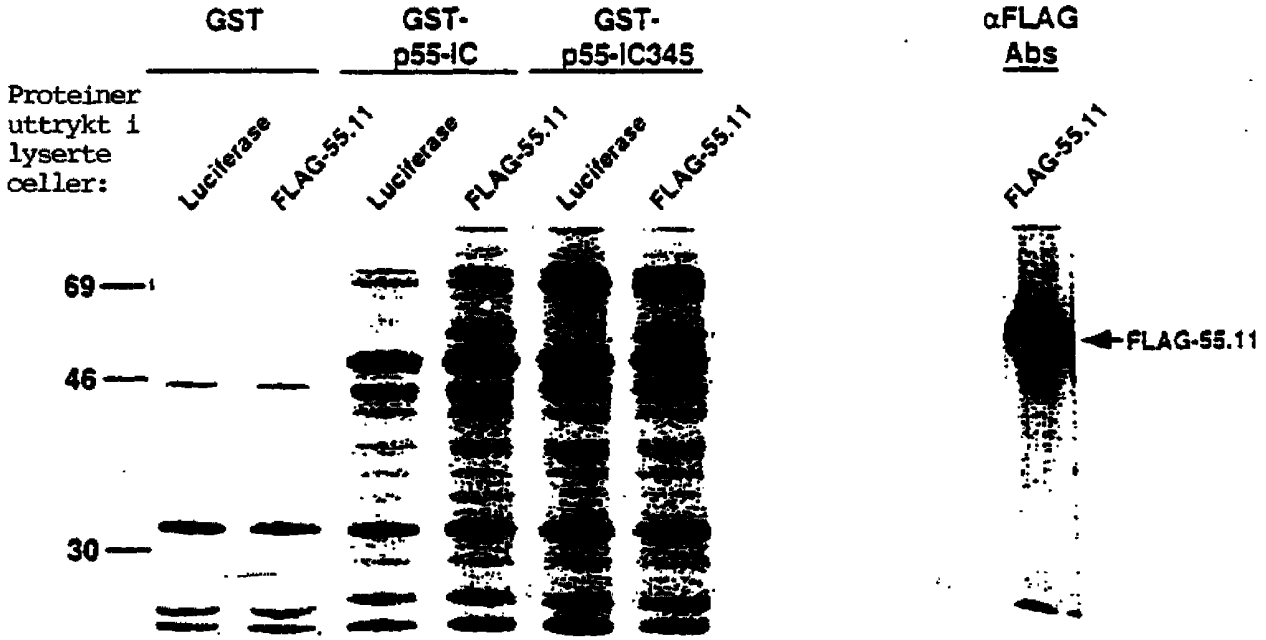


FIGUR 2

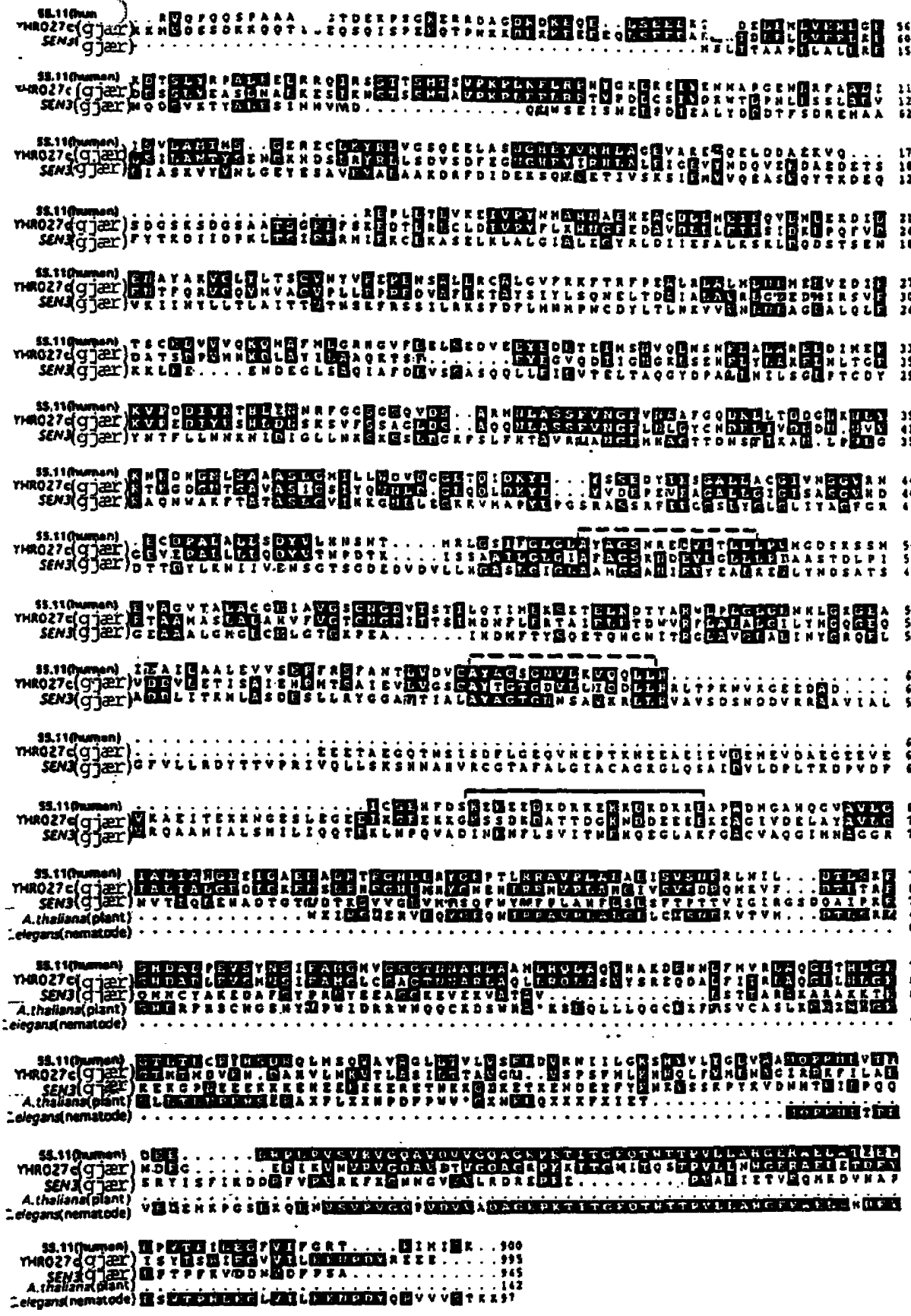
A


BINDING TIL GST FUSJONSPROTEINER
IMMUNOPREC.
GST
GST-p55-IC
GST-p55-IC345
α55.11 Abs
Proteiner uttrykt i lyserte celler:
Luciferase
55.11-full
97
69
46
55.11-full

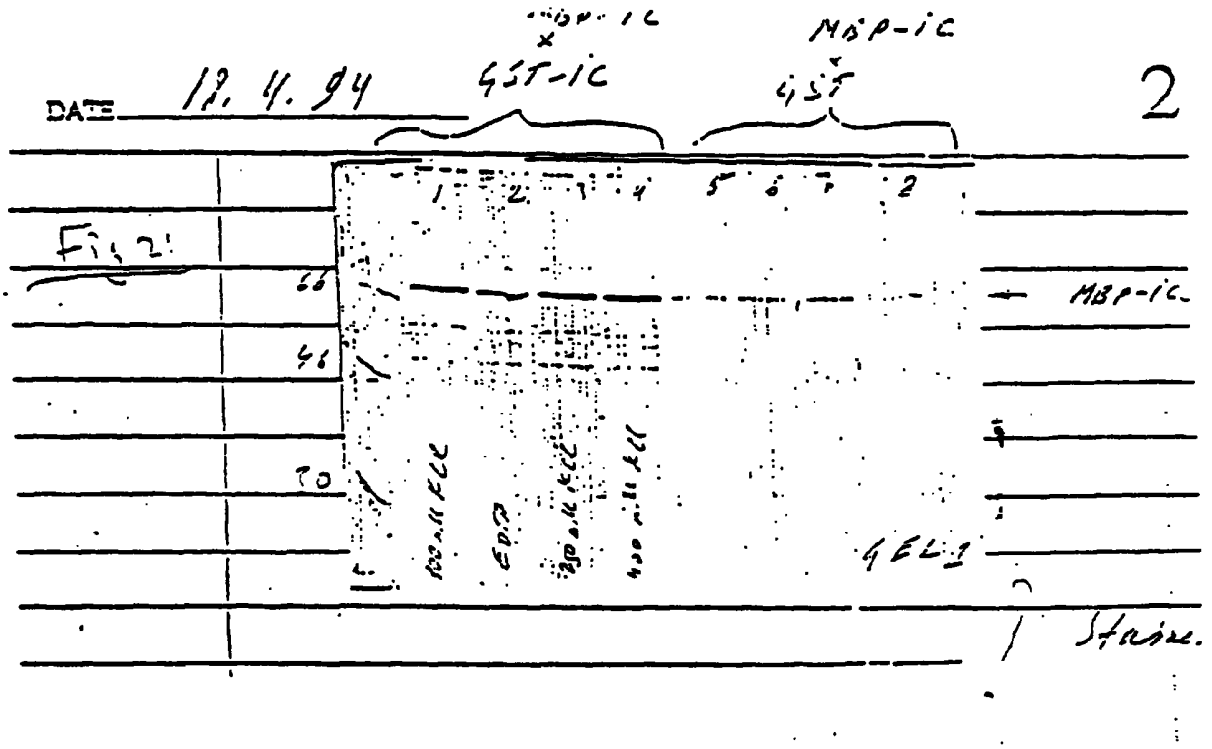
B


BINDING TIL GST FUSJONSPROTEINER
IMMUNOPREC.
GST
GST-p55-IC
GST-p55-IC345
αFLAG Abs
Proteiner uttrykt i lyserte celler:
Luciferase
FLAG-55.11
69
46
30
FLAG-55.11

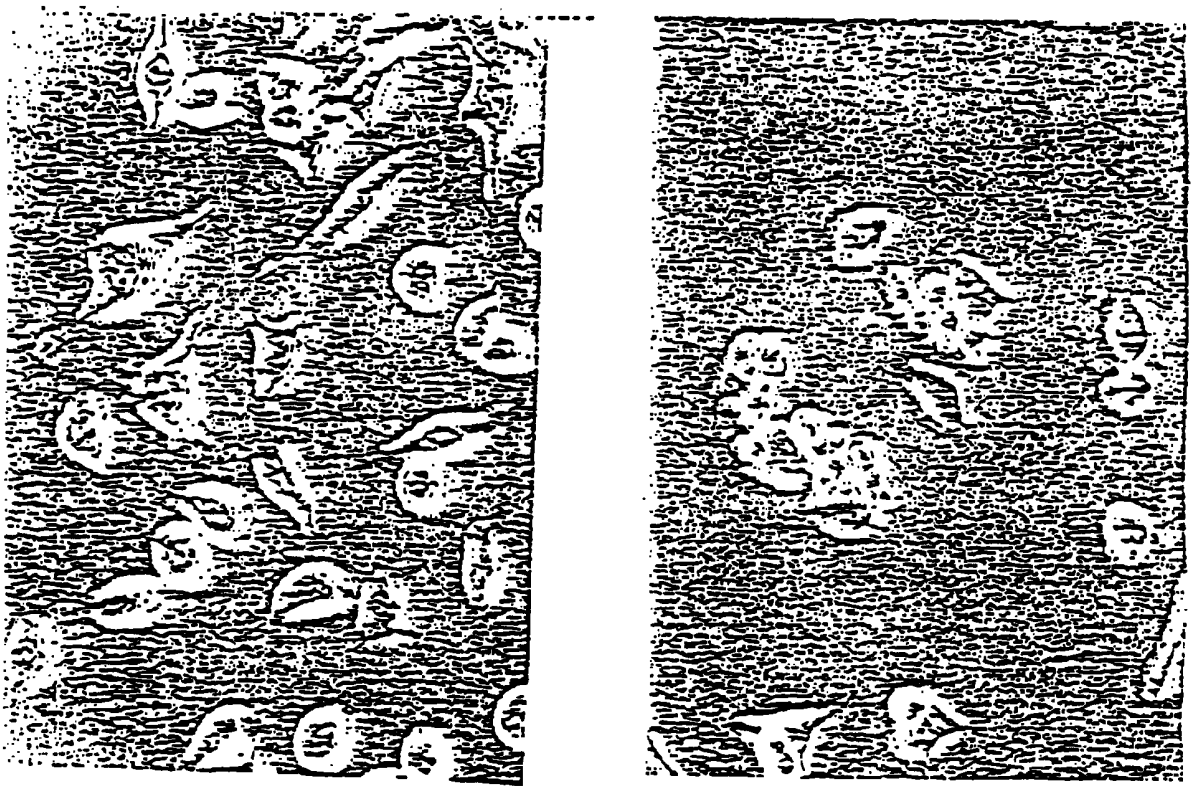
FIGUR 3



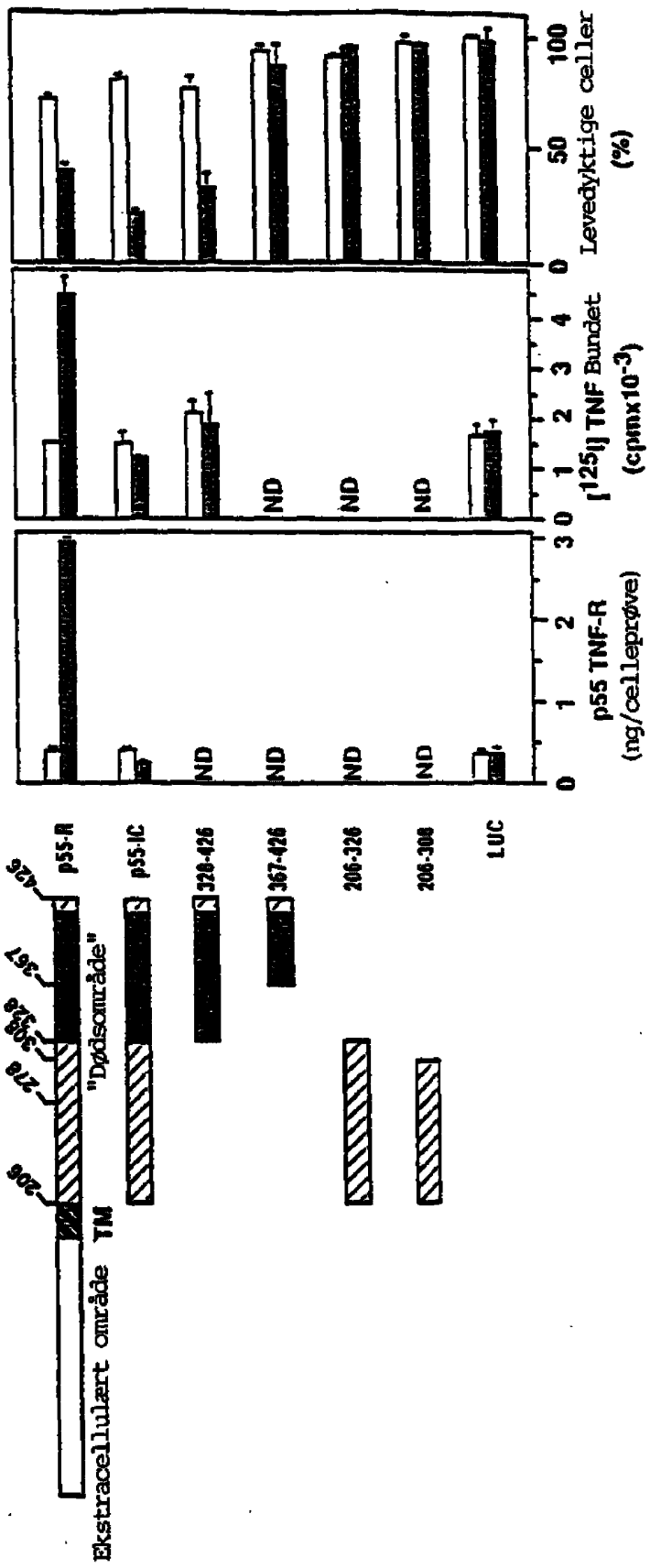
FIGUR 4



FIGUR 5

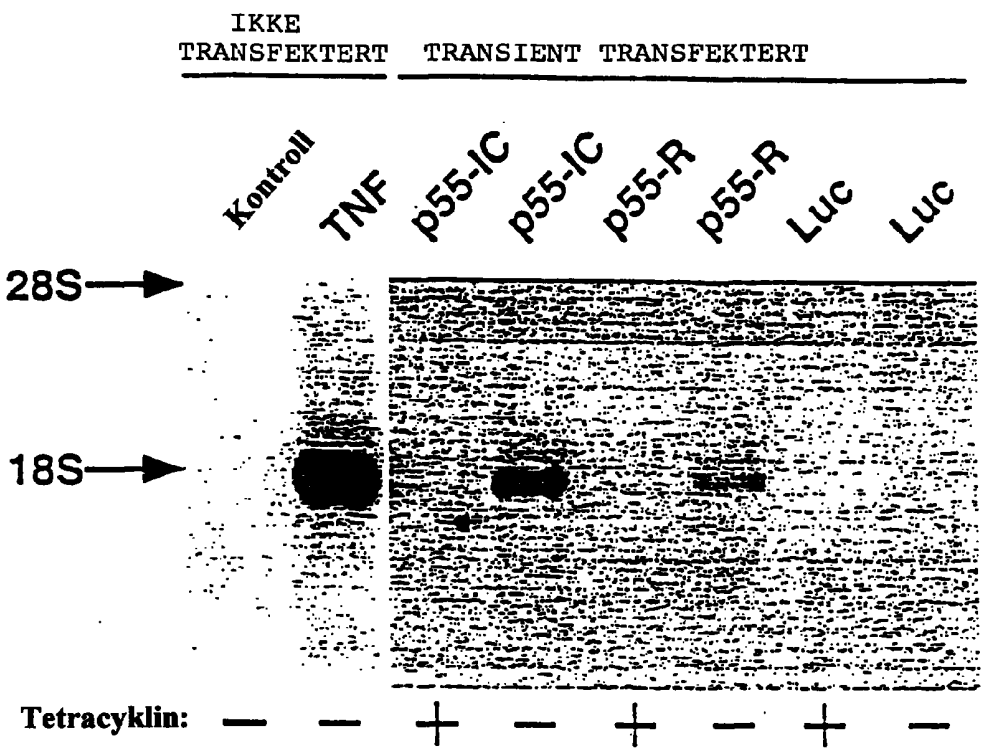


FIGUR 6

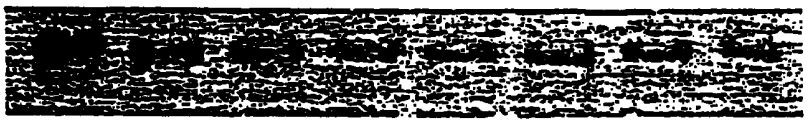

Levedyktige celler (%)
0
50
100
[125I] TNF Bundet (cpmx10-3)
0
1
2
3
4
ND
ND
ND
p55 TNF-R (ng/celleprøve)
0
1
2
3
ND
ND
ND
ND
p55-R
p55-IC
328-426
367-426
206-326
206-308
LUC
"Dødsområde"
TM
Ekstracellulært område

FIGUR 7

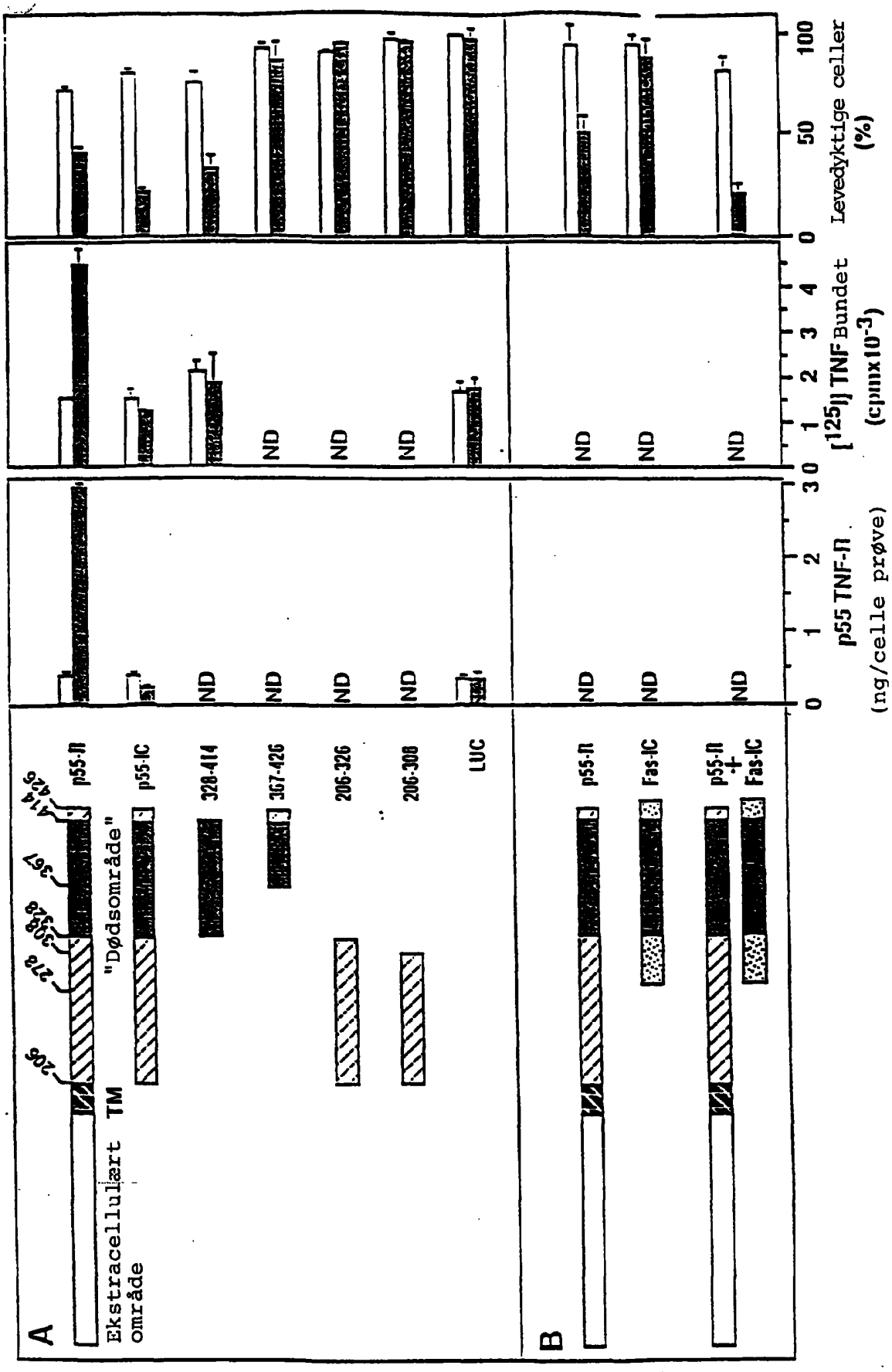
A


IKKE
TRANSFEKTERT
TRANSIENT TRANSFEKTERT
Kontroll
TNF
p55-IC
p55-IC
p55-R
p55-R
Luc
Luc
28S
18S
Tetracyklin: — — + — + — + —

B



FIGUR 8


A
Ekstracellulært område
TM
"Dødsområde"
p55-fl
p55-IC
328-414
367-426
206-326
206-308
LUC
206
278
308
328
367
414
426
ND
B
p55-fl
Fas-IC
p55-fl + Fas-IC
p55 TNF-fl (ng/celle prøve)
0 1 2 3
[125I] TNF Bundet (cpmx10-3)
0 1 2 3 4
Levedyktige celler (%)
0 50 100

FIGUR 9

72 klone

FIGUR 10

F9 klone

FIGUR 11

DD11 klone

FIGUR 12