



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 323252

(13) B1

(51) Int Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19972024	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.10.27 PCT/US95/14024
(22)	Inng.dag	1997.04.30	(85)	Videreføringsdag	1997.04.30
(24)	Løpedag	1995.10.27	(30)	Prioritet	1994.11.03, US, 336235
(41)	Alm.tilgj	1997.07.02			
(45)	Meddeit	2007.02.12			
(73)	Innehaver	The Regents of the University of California , 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, CA94612-3350 OAKLAND, US			
(72)	Oppfinner	Thai D. Nguyen, Mill Valley, CA, US Jon R. Polansky, Mill Valley, CA, US Weidong Huang, San Francisco, CA, US			
(74)	Fullmektig	JK Thorsens Patentbureau AS, Postboks 9276 Grønland, 0134 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Hovedsakelig rensset nukleinsyremolekyl, nukleinsyremolekyl, rensset TIGR-protein, protein, anti-TIGR-antistoff eller antigen-bindingsfragment derav samt fremgangsmåte for å diagnostisere glaukom			
(56)	Anførte publikasjoner	J.R. Polansky et al., Glaucoma Update IV, 1991, side 20-29. Nguyen et al., Schriftenreihe der Akademie de Wissenschaften und der Literature, Mainz, 1993 side 307-318 Nguyen et al., sammendrag i Invest. Ophthamol. Vis. Sci., vol. 32, side 789, 1991			
(57)	Sammendrag				

Et glukokortikoid-indusert protein, TIGR, som er dannet ved hjelp av celler i trabekelverket kan anvendes til å diagnostisere glaukom. TIGR proteinet, anti-TIGR antistoffer og TIGR kodende sekvenser tilveiebringer også et diagnostika for glaukom og relaterte sykdommer.

Den foreliggende oppfinnelse er innenfor området av diagnostika, og vedrører midler og en fremgangsmåte for diagnostisering av glaukom ifølge kravinnledningene.

5 "Glaukomer" er en gruppe svekkende øyesykdommer som er den viktigste årsak til blindhet som kan forhindres i USA og andre utviklede land. "Primary Open Angle Glaucoma" (POAG) er den mest vanlige formen av glaukom. Sykdommen er kjenne-
10 tegnet ved nedbrytning av trabekelverket, noe som fører til obstruksjon av kammervannets normale evne til å forlate øyet uten lukking av rommet (f.eks. "vinkelen") mellom iris og kornea (se Vaughan, D. et al., i: General Ophtamology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, s. 213-230 (1992)). En karakteristikk av en slik obstruksjon i denne sykdom er et økt
15 intraokulært trykk (IOP), noe som resulterer i et progressivt tap av synet og med blindhet dersom dette ikke behandles passende og innenfor en bestemt tidsperiode.

Sykdommen er estimert til å ramme mellom 0,4% og 3,3% av alle
20 voksne over 40 år (Leske, M.C. et al., Amer. J. Epidemiol. 113:1843-1846 (1986), Bengtsson, B., Br. J. Ophtamol. 73:483-487 (1989); Strong, N. P., Ophtal. Physiol. Opt. 12:3-7 (1992)). Dessuten øker sykdommens utbredelse med alder til over 6% hos den som er 75 år eller eldre (Strong, N.P.,
25 Ophtal. Physiol. Opt. 12:3-7 (1992)).

Man har lenge hatt en mistanke om en forbindelse mellom pasienters IOP respons på glukokortikoider og sykdommen POAG. Mens kun 5% av den normale befolkning viser en høy IOP økning
30 (16 mm Hg) overfor topisk glukokortikoidtesting, viser over 90% av pasienter med POAG denne respons. I tillegg kan et "open angle" glaukom induseres ved eksponering for glukokortikoider. Denne observasjon har foreslått at en økt eller unormal glukokortikoidrespons i trabekelceller kan være
35 involvert i POAG (Zhan, G.L. et al., Exper. Eye Res. 54:211-218 (1992)), Yun, A.J. et al., Invest. Ophtamol. Vis. Sci. 30:2012-2022 (1989), Clark, A.F., Exper. Eye Res. 55:265 (1992), Klemetti, A., Acta Ophtamol. 68:29-33 (1990), Knepper, P.A., US patent nr. 4.617.299).

Glukokortikoiders evne til å indusere en glaukom-lignende tilstand har ført til forsøk på å identifisere gener eller genprodukter som vil induseres ved hjelp av cellene i trabekelverket som en respons på glukokortikoider (Polansky, J.R. et al., i: Glaucoma Update IV, Springer-Verlag, Berlin, s. 20-29 (1991)). Initiale forsøk ved anvendelse av korttids eksponering for deksametason viste kun forandringer i spesifikk proteinsyntese. Utvidet eksponering for relativt høye nivåer av deksametason ble imidlertid funnet til å indusere ekspresjon av relaterte 66 kD og 55 kD proteiner som kunne visualiseres ved hjelp av gelelektroforese (Polansky, J.R. et al., i: Glaucoma Update IV, Springer-Verlag, Berlin, s. 20-29 (1991)). Induksjonskinetikene til disse proteiner såvel som deres dose-responseegenskaper var svært like de kinetikene som var nødvendige for steroidindusert IOP økning i humane individer (Polansky, J.R. et al., i: Glaucoma Update IV, Springer-Verlag, Berlin, s. 20-29 (1991)). Problemer med aggregering og tilsynelatende ustabilitet eller tap av protein i renseprosessen var hindringer for å oppnå en direkte proteinsekvens.

Fordi økt IOP er en enkel målbar egenskap i forbindelse med glaukom, blir diagnosen for sykdommen i stor grad screenet ved å måle intraokulært trykk (tonometri) (Strong, N.P., Ophtal. Physiol. Opt. 12:3-7 (1992), Greve, M. et al., Can. J. Ophtamol. 28:201-206 (1993)). Fordi glaukomatøse og normale trykkområder dessverre overlapper hverandre, er slike metoder av begrenset verdi dersom ikke flere avlesninger gjennomføres (Hitchings, R.A., Br.J. Ophtamol. 77:326 (1993), Tuck, M.W. et al., Ophtal. Physiol. Opt. 13:227-232 (1993), Vaughan, D. et al., i: General Ophtamology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, s. 213-230 (1992), Vernon, S.A., Eye 7:134-137 (1993)). På grunn av dette blir ofte ytterligere metoder slik som direkte undersøkelse av den blinde flekk og bestemmelse av omfanget av pasientens tap av synsfelt, gjennomført for å forbedre diagnosenøyaktigheten (Greve, M. et al., Can. J. Ophtamol. 28:201-206 (1993)).

På bakgrunn av viktigheten av glaukom, og de i det minste delvise utilstrekkeligheter i forbindelse med de tidligere kjente diagnosemetoder, vil det være ønskelig å ha en forbedret, mere nøyaktig metode for å diagnostisere glaukom. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer slike forbedrede diagnostiske midler og metoder.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et hovedsakelig rensset nukleinsyremolekyl som omfatter et 15 til 250 nukleotid-fragment av et polynukleotid med sekvensen SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3, og vedrører også et nukleinsyremolekyl som omfatter komplementet derav.

Oppfinnelsen vedrører også et rensset TIGR protein som har sekvensen SEQ ID NO:1 som kodet for av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen, og vedrører også et protein som omfatter et polypeptid med sekvensen SEQ ID NO:1 som kodet for av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen vedrører videre et anti-TIGR antistoff eller et antigen-bindingsfragment derav, eller et enkelt-kjede antigen-bindingsmolekyl eller et antigen-bindingsfragment derav, som er i stand til spesifikk binding til et rensset TIGR protein med sekvensen SEQ ID NO:1.

Endelig vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for å diagnostisere glaukom som omfatter trinnene med: inkubasjon under betingelser som tillater nukleinsyrehybridisering, av et markør-nukleinsyremolekyl, idet markør-nukleinsyremolekylet omfatter et TIGR nukleinsyremolekyl som angitt i ett av kravene 1 eller 2, og et komplementært nukleinsyremolekyl oppnådd fra en celle eller et kroppsfluid fra en pasient, hvori nukleinsyrehybridisering mellom markør-nukleinsyremolekylet og det komplementære nukleinsyremolekylet oppnådd fra pasienten tillater deteksjonen av en polymorfisme hvis tilstedeværelse indikerer en mutasjon som påvirker sekresjon av et TIGR protein som angitt i ett av kravene 4 til 5 i pasienten;

tillate hybridisering mellom det TIGR-kodende markør-nukleinsyremolekylet og det komplementære nukleinsyremolekylet oppnådd fra pasienten; og

- 5 detekttere tilstedeværelsen av polymorfismen, hvori deteksjonen av polymorfismen er en diagnose av glaukom.

Kort beskrivelse av figuren:

Fig. 1A-1D tilveiebringer aminosyresekvensen til TIGR proteinet og sekvensen til det cDNA som koder for TIGR proteinet.

Som indikert i det foregående er trabekelverket blitt foreslått til å spille en viktig rolle i den normale strømmingen av kammervannet, og er blitt antatt til å være hovedstedet for utstrømningsresistens i glaukomatøse øyne. Humane trabekelverk ("Human trabecular meshwork" HTM) celler er endotellignende celler som dekker utstrømningskanalene hvorved kammervannet strømmer ut fra øyet, og endret syntese- funksjon til cellene kan være involvert i patogenesen av steroid glaukom og andre typer glaukom. Langvarig steroidbehandling av disse celler er interessant fordi den viste at en viktig forskjell ble observert når man sammenligner med en 1-2 døgns glukokortikoid (GC) eksponering, som synes relevant ved det kliniske angrep av steroid glaukom (1-6 uker).

25

Til tross for tiår med forskning før den foreliggende oppfinnelse, er den molekylære basis for glaukom ikke blitt bestemt (Snyder, R.W. et al., *Exper. Eye Res.* 57:461-468 (1993), Wiggs, J.L. et al., *Genomics* 21:299-303 (1994)).

30

Skjønt trabekelverkceller er blitt funnet til å indusere spesifikke proteiner som respons på glukokortikoider (se Polansky, J.R., i: "Schriftenreihe de Academie der Wissenschaften under der Litteratur, Mainz", 307-318 (1993)), ble forsøk på å rense det uttrykte protein hindret ved uoppløselighet og andre problemer. Nguyen, T.D. et al., (i: "Schriftenreihe de Academie der Wissenschaften under der Litteratur, Mainz", 331-343 (1993)) anvendte molekylær kloning for å isolere en sterkt indusert mRNA type fra

35

glukokortikoid-induserte humane trabekelceller. mRNAet utviste et induksjons-tidsforløp i likhet med det til de glukokortikoid-induserte proteiner. Klonet ble betegnet "II.2".

5

Den foreliggende oppfinnelse stammer delvis fra den anerkjennelse at det isolerte II.2 klonet koder for et nytt sekretjonsprotein (betegnet "Trabecular Meshwork Induced Glucocorticoid Response" protein eller "TIGR") som induseres i celler i trabekelverket ved eksponering for glukokortikoider. Det er blitt foreslått at dette protein kan avsettes i de ekstracellulære rom i trabekelverket og binde til overflaten av endotelcellene som dekker trabekelverket, og således føre til et fall i kammervannstrøm. Kvantitativ dot-blot analyse og PCR evalueringer har vist at TIGR mRNA utviser en progressiv induksjon over tid mens andre kjente GC-induksjoner fra andre systemer og funnet i HTM celler (metallotionin, alfa-1-syreglykoprotein og alfa-1-antichymotrypsin) nådde et maksimumnivå i løpet av 1 døgn eller tidligere. Av spesiell interesse var det at induksjonsnivået til dette klon var svært høyt (4-6% total cellulær mRNA) og med kontrollnivå som var upåvisbart uten PCR metode. Basert på studier av ³⁵S metionin-cellemerking, har klonet de egenskaper som nylig er funnet for det viktigste GC-induserte ekstracellulære glykoprotein i disse celler, som er et "sialenated" N-glykosylert molekyl med et putativt inositol-fosfatanker. Induksjonen av TIGR RNA nærmet seg 4% av total cellulær mRNA. mRNA økte progressivt over 10 døgn med deksametasonbehandling.

II.2 klonet er 2,0 kb mens Northern blotting viste et bånd ved 2,5 kb. Skjønt det ikke inkluderer en poly A hale, inneholder 3' enden av klonet to konsensus polyadenylerings-signaler. Southern analyse foreslo to grupper av genomiske sekvenser og to genomiske kloner ble isolert. In-situ hybridisering ved anvendelse av denne genomiske probe viste genlokaliseringer på kromosom 1, p36 og 12, p13, p15. Studium av cykloheksamidbehandling i fravær og nærvær av GC foreslo at induksjonen av TIGR kan involvere faktorer i tillegg til GC reseptoren. TIGR genen kan være involvert i

den cellulære stressrespons da det også induseres ved stimuleringsmidler som H₂O₂, TPA, glukose og varme, og dette faktum kan relatere til glaukompatogenese og behandling.

5 Aminosyresekvensen til TIGR, den cDNA sekvens som koder for TIGR og 2,0 kb nukleotidsekvensen som inneholder denne kode-region er vist i fig. 1A-1D. Aminosyresekvensen for TIGR er vist i fig. 1A-1D (og i SEQ ID NO:1). Nukleotidsekvensen til SEQ ID NO:2 er den til TIGR cDNA molekylet som er vist i fig.
10 1A-1D. Delen av SEQ ID NO:2 som er vist i fig. 1A-1D som kodende for TIGR proteinet er angitt som SEQ ID NO:3.

Den primære struktur av TIGR initierer fra et ATG initieringssete (SEQ ID NO:2, rest 1) og inkluderer en 20 aminosyre
15 konsensus signalsekvens i et andre ATG (SEQ ID NO:2, rest 15), noe som indikerer at proteinet er et sekresjonsprotein. Proteinet inneholder et N-bundet glykosyleringssete som er lokalisert i den mest hydrofile region i molekylet. Den aminoterminal del i proteinet er svært polarisert og
20 adopterer alfa-heliks struktur som vist ved hydropatiprofilen og ved Garnier-Robinson strukturanalysen. I motsetning til dette inneholder proteinet en 25 aminosyre hydrofob region nær karboksyterminalen. Denne region kan omfatte en GIP ankersekvens. Oppfinnelsen vedrører således to TIGR
25 proteiner: TIGR og en bearbeidet form av TIGR.

TIGR proteinet inneholder også 5 putative O-bundne glykosyleringsseter gjennom molekylet. "Leucin zipper" (Leucin-glidelås) regioner definerer en heliks struktur som tillater
30 at det forekommer protein-protein binding (se generelt Tso, J.Y. et al., PCT patentsøknad WO 93/11162, Land, K.H. et al., PCT patentsøknad WO 93/19176). TIGR proteinet inneholder 7 leucin zipper enheter. Tilstedeværelsen av zipper regionene tilveiebringer et middel for TIGR molekylerne til å binde til
35 hverandre med dannelse av makromolekyler og eventuelt aggregering. Studier som viser den spesifikke binding av dette molekyl til HTM celler (men ikke til fibroblastceller) understøtter oppfatningen om at det kan influere på utstrømningsbanen i HTM vev til å bevirke det økte intraokulære trykk som

kjennetegner glaukom og relaterte sykdommer. TIGR protein er også vellykket blitt uttrykt ved anvendelse av baculovirus systemet og Sf9 insektceller. De viktigste rekombinante proteiner er de to 55 kD cellulære proteiner kodet for av TIGR cDNA. Antistoffer dannet fra disse proteiner gjenkjenner både de cellulære 55 kD proteiner og den utskilte 66 kD glykosylerte form av disse proteiner i deksametasonbehandlede HTM celler og i organ-kultursystemer. In situ analyser av prøver av glaukomatøst vev viser et høyt ekspresjonsnivå av dette protein i forhold til normale kontroller.

Tilstedeværelse, induksjon og nivå av TIGR sekresjonsprotein avspeiler inntreden og kinetikkene hvormed glukokortikoider induserer glaukom, og den glukokortikoid-induserte ekspresjon av dette sekresjonsprotein omfatter den molekylære basis for glaukom og dets relaterte sykdommer. En slik forståelse på molekylært grunnlag tillater definisjonen av diagnostiske midler for glaukom og dets relaterte sykdommer.

Som anvendt heri har betegnelsen "glaukom" sin betydning som er kjent innenfor fagområdet, og inkluderer både primære glaukomer, sekundære glaukomer og familiære (dvs. arvede) glaukomer.

Frengangsmåten i henhold til oppfinnelsen er særlig relevant for å diagnostisere POAG, OAG, juvenil glaukom og arvede glaukomer. En sykdom eller tilstand sies å være relatert til glaukom dersom den innehar eller utviser et glaukomsymptom, f.eks. et økt intraokulært trykk resulterende fra kammervann-utstrømningsresistens (se Vaughan, D. et al., i: General Ophtamology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, s. 213-230 (1992)).

Midlene i henhold til oppfinnelsen kan anvendes til å diagnostisere tilstedeværelsen eller alvorligheten av glaukom og dets relaterte sykdommer hos en pasient som lider av glaukom ("en glaukomatøs pasient"). Slike midler kan enten være naturlig forekommende eller ikke-naturlig forekommende. Som anvendt heri kan et naturlig forekommende molekyl om ønsket

være "hovedsakelig rensset", slik at ett eller flere molekyler som er eller kan være tilstede i et naturlig forekommende preparat som inneholder dette molekyl er blitt fjernet eller vil være tilstede i en mindre konsentrasjon enn den som man normalt vil finne.

Midlene i henhold til oppfinnelsen vil foretrukket være "biologisk aktive" med hensyn til enten en strukturell egenskap, slik som en nukleinsyres evne til å hybridisere til et annet nukleinsyremolekyl, eller et proteins evne til å binde med et antistoff (eller til å konkurrere med et annet molekyl for slik binding). En slik egenskap kan alternativt være katalytisk, og således involvere middelets kapasitet til å mediere en kjemisk reaksjon eller respons.

Midlene i henhold til oppfinnelsen omfatter nukleinsyremolekyler, proteiner og organiske molekyler.

A. Nukleinsyremolekyler

En foretrukket klasse av midler i henhold til oppfinnelsen omfatter TIGR nukleinsyremolekyler ("TIGR molekyler"). Slike molekyler kan være enten DNA eller RNA.

I en utførelsesform vil slike nukleinsyremolekyler kode for hele eller et fragment av TIGR proteinet, dets "promoter" eller flankerende gensekvenser. Som anvendt heri, anvendes betegnelsen "promoter" i en omfattende betydning til å referere til den eller de reguleringssekvenser som kontrollerer mRNA produksjon. Slike sekvenser inkluderer RNA polymerasebindingssteder, glukokortikoid responselementer, enhancere osv. Alle slike TIGR molekyler kan anvendes til å diagnostisere tilstedeværelsen av glaukom og alvorligheten av glaukom.

Fragment TIGR nukleinsyremolekyler kan kode for en eller flere signifikante deler av, eller i realiteten det meste av, TIGR proteinet. Nukleinsyremolekylet ifølge oppfinnelsen omfatter mindre oligonukleotider med fra 15 til 250 nukleotidrester, mere foretrukket fra 15 til 30 nukleotidrester. Slike oligonukleotider kan anvendes som prober av TIGR mRNA.

For et slikt formål må oligonukleotidene være istand til spesifikt å hybridisere til et TIGR nukleinsyremolekyl. Som anvendt heri sies to nukleinsyremolekyler å være istand til spesifikt å hybridisere til hverandre dersom de to molekyler er istand til å danne en anti-parallell, dobbeltrådet nukleinsyrestruktur, mens de ikke er istand til å danne en dobbeltrådet struktur når de inkuberes med et ikke-TIGR nukleinsyremolekyl. Et nukleinsyremolekyl sies å være "komplementet" av et annet nukleinsyremolekyl dersom de utviser fullstendig komplementaritet. Som anvendt heri, sies molekyler å utvise "fullstendig komplementaritet" når hvert nukleotid i ett av molekylene er komplementært til et nukleotid i det andre. To molekyler sies å være "minimalt komplementære" dersom de kan hybridisere til hverandre med tilstrekkelig stabilitet til å tillate at de forblir annealet til hverandre under i det minste konvensjonelle "lav-stringens" betingelser. Likeledes sies molekyler å være "komplementære" dersom de kan hybridisere til hverandre med tilstrekkelig stabilitet til å tillate at de forblir annealet til hverandre under konvensjonelle "høy-stringens" betingelser. Konvensjonelle stringensbetingelser er beskrevet av Sambrook, J. et al., (i: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)), og av Haymes, B.D. et al., (i: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985)). Avvik fra fullstendig komplementaritet er derfor tillatt så lenge slike avvik ikke fullstendig utelukker molekylenees kapasitet til å danne en dobbeltrådet struktur. For at et oligonukleotid skal tjene som en primer, behøver det således kun å være tilstrekkelig komplementært i sekvens for å kunne danne en stabil dobbeltrådet struktur under de spesielle løsningsmiddel- og saltkonsentrasjoner som anvendes.

Bortsett fra deres anvendelse som diagnostika, kan de nevnte oligonukleotider anvendes for å oppnå andre TIGR nukleinsyremolekyler. Slike molekyler inkluderer det TIGR-kodende nukleinsyremolekyl av ikke-humane dyr (særlig katter, aper, gnagere og hunder), fragmenter derav så vel som deres

promotere og flankeringssekvenser. Slike molekyler kan lett oppnås ved å anvende de ovennevnte primere til å screene cDNA eller genomiske biblioteker oppnådd fra ikke-humane arter. Metoder for å danne slike biblioteker er vel kjent innen 5 teknikken. Slike analoger kan avvike, i deres nukleotidsekvenser, fra den til SEQ ID NO:1, fordi fullstendig komplementaritet ikke behøves for stabil hybridisering. TIGR nukleinsyremolekylene i henhold til oppfinnelsen inkluderer derfor også molekyler som, skjønt de er istand til spesifikk 10 hybridisering med TIGR nukleinsyremolekyler, kan mangle "fullstendig komplementaritet".

Hvilken som helst av en rekke metoder kan anvendes for å oppnå de ovennevnte nukleinsyremolekyler. SEQ ID NO:2 kan 15 anvendes til å syntetisere hele eller en hvilken som helst del av TIGR proteinet eller TIGR cDNA (Zamechik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83:4143 (1986), Goodchild et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5507 (1988), Wickstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:1028, Holt, J.T. et 20 al., Molec. Cell. Biol. 8:963 (1988), Gerwitz, A.M. et al., Science 242:1303 (1988), Anfossi, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:3379 (1989), Becker, D. et al., EMBO J. 8:3679 (1989)). Automatiserte nukleinsyresyntetisatorer kan anvendes for dette formål. I stedet for slik syntese, 25 kan den angitte SEQ ID NO:2 anvendes til å definere et par primere som kan anvendes med polymerasekjedereaksjonen (Mullis, K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986), Erlich H. et al., EP 50.424, EP 84.796, EP 258.017, EP 237.362, Mullis, K., EP 201.184, Mullis K. et 30 al., US 4.683.202, Erlich, H., US 4.582.788 og Saiki, R. et al., US 4.683.194)) for å amplifisere og oppnå et hvilket som helst ønsket TIGR-kodende DNA molekyl eller fragment.

Den eller de TIGR promotersekvensene og TIGR flankesekvensene 35 kan også oppnås ved anvendelse av SEQ ID NO:2 sekvensen tilveiebragt heri. I en utførelsesform oppnås slike sekvenser ved å inkubere oligonukleotidprober av TIGR oligonukleotider med medlemmer av genomiske humane biblioteker og utvinne kloner som hybridiserer til probene. I en annen utførelses-

form kan metoder av "chromosome walking", eller 3' eller 5' RACE anvendes (Frohman M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:8998-9002 (1988), Ohara, O. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:5673-5677 (1989)) for å oppnå slike
5 sekvenser.

B. TIGR protein og peptidmolekyler

En annen foretrukket klasse av midler ("TIGR molekyler") omfatter TIGR proteinet, dets peptidfragmenter, fusjons-
10 proteiner og analoger. Som anvendt heri refererer betegnelsen "TIGR protein" til et protein med aminosyresekvensen SEQ ID NO:1. TIGR protein kan dannes via kjemisk syntese eller mere foretrukket ved å uttrykke TIGR kodende cDNA i en passende bakteriell eller eukaryotisk vert. Mest foretrukket
15 kan sub-sekvensen av slik cDNA som koder for TIGR anvendes for dette formål (SEQ ID NO:3). Alternativt kan hele cDNA (SEQ ID NO:2) som vist i fig. 1A-1D anvendes. Passende metoder for ekspresjon er beskrevet av Sambrook, J. et al., (i: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold
20 Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)), eller lignende tekster.

Et "TIGR fragment" er et peptid eller polypeptid hvis aminosyresekvens omfatter en undergruppe av aminosyresekvensen av
25 TIGR proteinet. Et TIGR protein eller fragment derav som omfatter en eller flere ytterligere ikke-TIGR peptidregioner er et "TIGR fusjonsprotein". Slike molekyler kan derivatiseres til å inneholde karbohydrat eller andre enheter (som albueskjell-hemocyanin osv.). Som i tilfellet med TIGR
30 protein vil fragmentene og fusjonene foretrukket dannes via rekombinante metoder.

Analogene av TIGR molekylerne omfatter TIGR proteiner, fragmenter eller fusjoner hvor ikke-essensielle eller ikke-
35 relevante aminosyrerester er blitt addert, erstattet eller utelatt. Et eksempel på en slik analog er TIGR proteinet til ikke-humane arter, som primater, hunder, katter osv. Slike analoger kan enkelt oppnås ved en hvilken som helst av en rekke metoder. Mest foretrukket, som indikert i det fore-

gående, vil den angitte SEQ ID NO:2 anvendes til å definere et par primere som kan anvendes for å isolere de TIGR-kodende nukleinsyremolekyler fra en hvilken som helst ønsket art. Slike molekyler kan uttrykkes til å gi TIGR analoger ved rekombinante metoder.

C. Antistoffer som er reaktive mot TIGR

Ett aspekt av den foreliggende oppfinnelse vedrører antistoffer, enkelt-kjede antigen-bindingsmolekyler eller andre proteiner som spesifikt binder til TIGR proteinet og dets analoger, fusjoner eller fragmenter. Slike antistoffer er "anti-TIGR antistoffer", og kan anvendes for å diagnostisere glaukom og dets relaterte sykdommer. Som anvendt heri sies et antistoff eller peptid å "spesifikt binde" til TIGR dersom slik binding ikke inhiberes på konkurrerende måte ved tilstedeværelsen av ikke-TIGR molekyler.

Nukleinsyremolekyler som koder for hele eller en del av TIGR proteinet kan uttrykkes, via rekombinante metoder, til å gi TIGR protein eller peptider som i sin tur kan anvendes til å utløse antistoffer som er istand til å binde TIGR. Slike antistoffer kan anvendes i immundiagnostiske analyser av glaukom. Slike TIGR-kodende molekyler eller deres fragmenter kan være et "fusjons"molekyl (dvs. en del av et større nukleinsyremolekyl) slik at et fusjonsprotein produseres ved ekspresjon.

Antistoffene som spesifikt binder TIGR proteiner og proteinfragmenter kan være polyklonale eller monoklonale, og de kan omfatte intakte immunoglobuliner, antigen bindingsdeler av immunoglobuliner (slik som $(F(ab')_2)$, $F(ab')_2$ fragmenter), eller enkelt-kjede immunoglobuliner som f.eks. kan produseres via rekombinante metoder.

Murine monoklonale antistoffer er særlig foretrukne. BALB/c mus er foretrukket for dette formål, men ekvivalente stammer kan imidlertid også anvendes. Dyrene immuniseres foretrukket med omtrent 25 μ g rensset TIGR protein (eller fragment derav) som er blitt emulgert i en passende adjuvans (som TiterMax

adjuvans (Vaxcel, Norcross, GA)). Immunisering gjennomføres foretrukket på to intramuskulære steder, et intraperitonealt sted og et subkutant sted i halefestet. I tillegg gis en intravenøs injeksjon av omtrent 25 μ g antigen foretrukket i normal saltløsning 3 uker senere. Etter omtrent 11 døgn etter den andre injeksjon tas det blodprøver fra musen og blodet screenes for tilstedeværelse av anti-TIGR antistoffer. En direkte bindings-ELISA anvendes foretrukket for dette formål.

10 Mest foretrukket blir musen som har det høyeste antistofftiter gitt en tredje intravenøs injeksjon på omtrent 25 μ g TIGR protein eller fragment. Miltleukocytter fra dette dyr utvinnes 3 døgn senere, og tillates deretter å fusjonere, mest foretrukket ved anvendelse av polyetylenglykol, med celler fra en passende myelomcellelinje (som f.eks. P3X63Ag8.653 myelomcellelinjen). Hybridomceller velges ved å dyrke cellene under "HAT" (hypoksantin-aminopterin-tymin) seleksjon i omtrent 1 uke. De oppnådde kloner kan deretter screenes for deres evne til å danne monoklonale antistoffer ("mAb") mot TIGR protein, foretrukket ved direkte ELISA.

I en utførelsesform blir anti-TIGR monoklonale antistoffer isolert ved anvendelse av TIGR fusjoner, eller konjugater, som immunogener. En gruppe mus kan således f.eks. immuniseres ved anvendelse av et TIGR fusjonsprotein emulgert i Freund's fullstendige adjuvans (omtrent 50 μ g antigen pr. immunisering). Ved 3 ukers intervaller emulgeres en identisk mengde antigen i Freund's ufullstendige adjuvans og anvendes til å immunisere dyrene. 10 døgn etter den tredje immunisering tas serumprøver og de evalueres for tilstedeværelse av antistoff. Dersom antistofftitere er for lave, kan en fjerde booster anvendes. Polyserum istand til å binde TIGR i en 1:5.000 fortykning kan også oppnås ved anvendelse av denne metoden.

I en foretrukket prosedyre for å oppnå monoklonale antistoffer blir miltceller fra de ovennevnte immuniserte mus fjernet, nedbrutt og immunsplenocytter isoleres over en

ficoll gradient. De isolerte splenocytter fusjoneres, ved
anvendelse av polyetylenglykol, med BALB/c-avlede
P3x63xAg8.653 plasmacytomaceller med HGPRT (hypoksan-
guaninfosforibosyltransferase) deficit. De fusjonerte celler
5 utplates på mikrotiterplater med 96 brønner og screenes for
hybridoma-fusjonsceller ved deres evne til å vokse i
dyrkingsmedium supplert med hypotantin, aminopterin og
thymidin i omtrent 2-3 uker. Gjennomsnittlig, gir omtrent
hver 10^6 miltceller underkastet fusjon et synlig hybridom.
10 En typisk milt gir $5-10 \times 10^7$ miltceller.

Hybridomceller som oppnås fra slik inkubasjon screenes fore-
trukket for deres evne til å danne et immunoglobulin som
binder til TIGR protein. En indirekte ELISA kan anvendes for
15 dette formål. Kort fortalt blir supernatantene av hybridomer
inkubert i mikrotiter brønner som inneholder immobilisert
TIGR protein. Etter vasking kan titeret av bundet immuno-
globulin bestemmes ved anvendelse av f.eks. et geit anti-mus
antistoff konjugert til pepperrotperoksydase. Etter ytter-
20 ligere vasking bestemmes mengden immobilisert enzym (f.eks.
gjennom bruk av et kromogent substrat). Slik screening ut-
føres så raskt som mulig etter identifikasjon av hybridom for
å sikre at et ønsket klon ikke blir overgrodd av ikke-utskil-
lende naboer. Det er ønskelig at fusjonsplaten screenes
25 flere ganger da hastighetene for hybridomvekst varierer. I
en foretrukket sub-utførelsesform, kan en annen antigen form
av TIGR anvendes til å screene hybridomer. Splenocyttene kan
f.eks. således immuniseres med ett TIGR immunogen, men de
oppnådde hybridomer kan screenes ved anvendelse av et annet
30 TIGR immunogen.

Som omtalt i det etterfølgende, kan slike antistoffmolekyler
eller deres fragmenter anvendes for diagnostiske formål. Der
antistoffene skal anvendes for diagnostiske formål kan det
35 være ønskelig å derivatisere dem, f.eks. med en ligandgruppe
(som biotin) eller en påvisbar markørgruppe (som en fluor-
escerende gruppe, en radioisotop eller et enzym).

Evnen til å produsere antistoffer som binder TIGR molekyler tillater identifikasjon av mimetiske forbindelser av TIGR. En "mimetisk forbindelse" av TIGR er en forbindelse som ikke er TIGR, eller et fragment av TIGR, men som likevel utviser en evne til spesifikt å binde til anti-TIGR antistoffer. Slike molekyler kan anvendes til å utløse anti-TIGR antistoffer, og kan således anvendes til å medvirke i diagnostisering av glaukom og dens relaterte sykdommer.

- 10 En særlig ønsket anvendelse i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse gjelder diagnosen av glaukom, POAG, pigmentær glaukom, høytensjonsglaukom og lavtensjonsglaukom og deres relaterte sykdommer. Som anvendt heri refererer betegnelsen "glaukom" til glaukom, POAG, pigmentær glaukom og lavtensjonsglaukom og deres relaterte sykdommer. Som indikert over lider metoder for å diagnostisere glaukom av unøyaktighet, og krever flere undersøkelser. Molekylene i henhold til oppfinnelsen kan anvendes til å definere svært gode analyser for glaukom. Bortsett fra slik bruk, kan molekylene i henhold til oppfinnelsen anvendes til å diagnostisere eller forutsi et individs følsomhet overfor økt intraokulært trykk ved administrering av steroider som glukokortikoider eller kortikosteroider. Deksametason, kortisol og prednisolon er foretrukne steroider for dette formål.
- 25 Medisinske tilstander som inflammatoriske og allergiske lidelser, såvel som mottagere av organtransplantasjoner drar fordel av behandling med glukokortikoider. Visse individer utviser en økt sensitivitet overfor slike steroider (dvs. "steroid sensitivitet"), som manifesteres ved en uønsket økning i intraokulært trykk. Den foreliggende oppfinnelse kan anvendes til å diagnostisere eller forutsi slik sensitivitet, såvel som glaukom og relaterte sykdommer.

I en første utførelsesform blir TIGR molekylene i henhold til oppfinnelsen anvendt til å bestemme om et individ har en mutasjon som påvirker nivået (dvs. konsentrasjonen av TIGR mRNA eller protein i en prøve osv.) eller mønsteret (dvs. kinetikken for ekspresjon, nedbrytningshastighet, stabilitetsprofil osv.) for TIGR ekspresjonen (kollektivt, "TIGR

responsen" til en celle eller et kroppsfluid) (f.eks. en mutasjon i TIGR genet, eller i en eller flere regulerende regioner eller et eller flere andre gener som kontrollerer eller påvirker ekspresjon av TIGR), og som kan forutsi hvilke individer som vil være pre-disponert for glaukom, relaterte lidelser eller steroid sensitivitet. Som anvendt heri sies TIGR responsen, som manifestert ved hjelp av en celle eller et kroppsfluid, å være "endret" dersom den avviker fra TIGR responsen i celler eller i kroppsfluider hos normale individer. Slik endring kan fastslås ved enten unormal økt eller unormal nedsatt TIGR respons. For å bestemme om en TIGR respons er endret, blir TIGR responsen som bestemt ved cellen eller kroppsfluidet fra pasienten sammenlignet med responsen i en lignende celleprøve (eller en kroppsfluidprøve) fra normale individer. Som det vil forstås er det ikke nødvendig å bestemme TIGR responsen i celleprøven (eller i kroppsfluidprøven) fra normale individer på nytt hver gang en slik sammenligning utføres, idet TIGR responsen fra et spesielt individ heller kan sammenlignes med tidligere oppnådde verdier hos normale individer.

I en sub-utførelsesform kan en slik analyse gjennomføres ved å bestemme tilstedeværelse og/eller identiteten til en eller flere polymorfismer i TIGR genet eller dets flankeregioner som er forbundet med glaukom, eller en pre-disposisjon for glaukom, relaterte sykdommer eller steroid sensitivitet.

Et hvilket som helst av en rekke molekyler kan anvendes til å identifisere en eller flere slike polymorfismer. I en utførelsesform kan TIGR cDNA sekvensen (eller en sub-sekvens derav) anvendes som et markør-nukleinsyremolekyl for å identifisere en eller flere slike polymorfismer. Alternativt kan slike polymorfismer detekteres gjennom bruk av et markør-nukleinsyremolekyl eller et markørprotein som er genetisk koblet til (dvs. et polynukleotid som ko-segregerer med) en eller flere slike polymorfismer. Som angitt over, er TIGR genet blitt kartlagt til p36 i kromosom 1, og til p13, q15 i kromosom 10, 11 eller 12. Markør-nukleinsyremolekyler som vil ha nukleotidsekvensen til et polynukleotid som er nær

genetisk koblet til en eller flere slike polymorfismer (f.eks. markører lokalisert i kromosom 1,p og kromosom 12,p, og mere foretrukket kromosom 1, p34-p38 og kromosom 12, p11-p17) er beskrevet heri. Polynukleotidmarkører som kartlegger
5 slike lokaliseringer er vel kjente og kan anvendes til å identifisere en eller flere slike polymorfismer.

Slike polymorfismer kan også detekteres gjennom bruken av et markør-nukleinsyremolekyl som er fysisk koblet til en eller
10 flere slike polymorfismer. For dette formål kan markør-nukleinsyremolekyler omfattende en nukleotidsekvens av et polynukleotid lokalisert innen 1 mb av en eller flere polymorfismer, og mere foretrukket innen 100 kb av en eller flere polymorfismer, og mest foretrukket innen 10 kb av en eller
15 flere polymorfismer, anvendes.

Genomene fra dyr og planter gjennomgår naturlig spontan mutasjon under deres kontinuerlige utvikling (Gusella, J.F., Ann. Rev. Biochem. 55:831-854 (1986)).

20

En "polymorfisme" i TIGR genet eller dets flankeregioner er en variasjon eller forskjell i sekvensen til TIGR genet eller dets flankeregioner som oppstår i enkelte medlemmer av en art. Variantsekvensen og den "originale" sekvens eksisterer
25 sammen i artens populasjon. I enkelte tilfeller er slik sam-eksistens i stabil eller kvasi-stabil likevekt.

En polymorfisme sies således til å være "allelisk", ved at, på grunn av eksistensen av polymorfismen, kan noen av medlem-
30 mene av en art ha den originale sekvens (dvs. det originale "allel") mens andre medlemmer kan ha variantsekvensen (dvs. variant "allelet"). I det enkleste tilfellet, kan kun én variantsekvens eksistere, og polymorfismen sies således å være di-allelisk. I andre tilfeller kan artenes populasjon
35 inneholde multiple alleler, og polymorfismen betegnes tri-allelisk osv. Et enkelt gen kan ha multiple forskjellige ikke-relaterte polymorfismer. Det kan f.eks. ha en di-allelisk polymorfisme på ett sted, og en multi-allelisk polymorfisme på et annet sted.

Variasjonen som definerer polymorfismen kan variere fra en enkelt nukleotidvariasjon til innskuddet eller delesjonen av ekstenderte områder innen et gen. I noen tilfeller er DNA sekvens variasjonene i regioner av genomet som er kjennetegnet ved korte tandem repetisjoner (STRer) som inkluderer tandem di- eller tri-nukleotid repeterte motiver av nukleotider. Polymorfismer kjennetegnet ved slike tandemrepetisjoner er omtalt som "variable number tandem repeat" ("VNTR") polymorfismer. VNTRer er blitt anvendt i identitets- og paternitetsanalyse (Weber, J.L., US patent 5.075.217, Armour, J.A.L. et al., FEBS Lett. 307:113-115 (1992), Jones, L. et al., Eur. J. Haematol. 39:144-147 (1987), Horn, G.T. et al., PCT søknad WO 91/14003, Jeffreys, A.J., europeisk patentsøknad 370.719, Jeffreys, A.J., US patent 5.175.082, Jeffreys, A.J., et al., Amer. J. Hum. Genet. 39:11-24 (1986), Jeffreys, A.J. et al., Nature 316:76-79 (1985), Gray, I.C. et al., Proc. R. Acad. Soc. Lond. 243:241-253 (1991), Moore, S.S. et al., Genomics 10:654-660 (1991), Jeffreys, A.J. et al., Anim. Genet. 18:1-15 (1987), Hillel, J. et al., Anim. Genet. 20:145-155 (1989), Hillel, J. et al., Genet. 124:783-789 (1990)).

Påvisning av polymorfe seter i en DNA prøve kan forenkles gjennom bruken av nukleinsyre amplifikasjonsmetoder. Slike metoder øker spesifikt konsentrasjonen av polynukleotider som spenner over det polymorfe sete, eller inkluderer dette sete og sekvenser lokalisert enten distalt eller proksimalt til det. Slike amplifiserte molekyler kan lett detekteres ved gelelektroforese eller ved hjelp av andre metoder.

Den mest foretrukne metode for å oppnå slik amplifikasjon anvender polymerasekjedereaksjonen ("PCR") (Mullis, K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986), Erlich H. et al., europeisk patentsøknad 50.424, europeisk patentsøknad 84.796, europeisk patentsøknad 258.017, europeisk patentsøknad 237.362, Mullis, K., europeisk patentsøknad 201.184, Mullis K. et al., US patent nr. 4.683.202, Erlich, H., US patent nr. 4.582.788 og Saiki, R. et al., US patent nr. 4.683.194), ved anvendelse av primerpar som er

istand til å hybridisere til de proksimale sekvenser som definerer en polymorfisme i sin dobbeltrådede form.

I stedet for PCR kan alternative metoder som "Ligase Chain Reaction" ("LCR") anvendes (Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:189-193 (1991)). LCR anvender to par av oligonukleotidprober for eksponensielt å amplifisere en spesifikk target. Sekvensen til hvert par av oligonukleotider velges for å tillate paret å hybridisere til til-
10 grensende sekvenser i den samme tråd av targeten. Slik hybridisering danner et substrat for en templat-avhengig ligase. Som med PCR, tjener de resulterende produkter således som et templat i etterfølgende sykluser og en eksponensiell amplifisering av den ønskede sekvens oppnås.

15 LCR kan utføres med oligonukleotider som har de proksimale og distale sekvenser av den samme tråd av et polymorft sete. I en utførelsesform vil hvert oligonukleotid utformes til å inkludere det reelle polymorfe sete av polymorfismen. I en
20 slik utførelsesform velges reaksjonsbetingelsene slik at oligonukleotidene kan ligeres sammen kun dersom targetmolekylet enten inneholder eller mangler det spesifikke nukleotid som er komplementært til det polymorfe sete tilstede på oligonukleotidet. Alternativt kan oligonukleotidene velges
25 slik at de ikke inkluderer det polymorfe sete (se Segev, D., PCT søknad WO 90/01069).

"Oligonukleotid Ligation Assay" ("OLA") kan alternativt anvendes (Landegren, U. et al., Science 241:1077-1080 (1988)).
30 OLA protokollen anvender to oligonukleotider som er utformet til å være istand til å hybridisere til tilgrensende sekvenser av en enkelt tråd av en target. OLA, lik LCR, er særlig egnet for deteksjon av punktmutasjoner. Til forskjell fra LCR resulterer imidlertid OLA i "lineær" heller enn eksponensiell amplifikasjon av targetsekvensen.
35

Nickerson, D.A. et al., har beskrevet en nukleinsyre-deteksjonsanalyse som kombinerer egenskaper for PCR og OLA (Nickerson, D. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)

87:8923-8927 (1990)). I denne metode anvendes PCR for å oppnå den eksponensielle amplifikasjon av target DNA, som deretter detekteres ved anvendelse av OLA. I tillegg til å kreve multiple og separate prosesstrinn, er et problem forbundet med slike kombinasjoner at de arver alle de problemer som er forbundet med PCR og OLA.

Systemer basert på ligering av to (eller flere) oligonukleotider i nærvær av nukleinsyre med sekvensen til det oppnådde "di-oligonukleotid", og derved amplifisere di-oligonukleotidet, er også kjent (Wu, D.Y. et al., Genomics 4:560 (1989)), og kan lett tilpasses til formålene med den foreliggende oppfinnelse.

Andre kjente nukleinsyreampifikasjonsprosedyrer, som allelspesifikke oligomerer, forgrenet DNA teknologi, transkripsjonsbaserte amplifikasjonssystemer eller isoterme amplifikasjonsmetoder kan også anvendes for å amplifisere og analysere slike polymorfismer (Malek, L.T. et al., US patent 5.130.238, Davey, C. et al., europeisk patentsøknad 329.822, Schuster et al., US patent 5.169.766, Miller H.I. et al., PCT søknad WO 89/06700, Kwoh, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:1173 (1989), Gingeras, T.R. et al., PCT søknad WO 88/10315, Walker, G.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:392-396 (1992)). Alle de ovennevnte nukleinsyreampifikasjonsmetoder kan anvendes til å forutsi eller diagnostisere glaukom.

Identifikasjonen av en polymorfisme i TIGR genet kan bestemmes på en rekke måter. Ved å korrelere tilstedeværelse eller fravær av glaukom i et individ med tilstedeværelse eller fravær av en polymorfisme i TIGR genet eller dets flankeregioner, er det mulig å diagnostisere pre-disposisjon hos en asymptomatisk pasient for glaukom, relaterte sykdommer eller steroidsensitivitet. Dersom en polymorfisme danner eller ødelegger et restriksjonsendonuklease-kuttesete, eller dersom det resulterer i tap eller innskudd av DNA (f.eks. en VNTR polymorfisme), vil det endre størrelsen eller profilen til de DNA fragmenter som dannes ved kutting med denne re-

striksjonsendonuklease. Som sådan kan individer som har en variantsekvens skjernes fra dem med den originale sekvens ved restriksjonsfragmentanalyse. Polymorfismer som kan identifiseres på denne måte betegnes "restriction fragment length polymorphisms" ("RFLPer"). RFLPer er omfattende anvendt i forbindelse med genetiske analyser i mennesker og dyr (Glassberg, J., UK patentsøknad 2135774, Skolnick, M.H. et al., Cytogen. Cell Genet. 32:58-67 (1982), Botstein, D. et al., Ann. J. Hum. Genet. 32:314-331 (1980), Fischer S.G. et al., (PCT søknad WO 90/13668), Uhlen, M. PCT søknad WO 90/11369)). Rollen til TIGR i glaukompatogenese indikerer at tilstedeværelsen av genetiske forandringer (f.eks. DNA polymorfismer) som påvirker TIGR responsen kan anvendes til å forutsi glaukom.

15

I overensstemmelse med denne utførelsesform av oppfinnelsen, oppnås en DNA prøve fra en pasients celler. I en foretrukket utførelsesform oppnås DNA prøven fra pasientens blod. En hvilken som helst DNA kilde kan imidlertid anvendes. DNA underkastes restriksjonsendonuklease kutting. TIGR anvendes som en probe i overensstemmelse med de ovennevnte RFLP metoder. Ved å sammenligne RFLP mønsteret til TIGR genet oppnådd fra normale pasienter og glaukomatøse pasienter, kan man bestemme pasientens pre-disposisjon for glaukom. Polymorfismen som oppnås på denne måte kan deretter klones for å identifisere mutasjonen i koderegionen som endrer proteinets struktur eller genets regulerende region som påvirker dets ekspresjonsnivå. Forandringer som involverer promoter interaksjoner med andre regulerende proteiner kan f.eks. identifiseres ved gel-skift-analyser ved anvendelse av HTM celleekstrakter, fluid fra det fremre øyekammer, serum osv. Interaksjoner av TIGR protein i glaukomatøse celleekstrakter, fluid fra det fremre øyekammer, serum osv. kan sammenlignes med kontrollprøver for derved å identifisere forandringer i de TIGR egenskaper som relaterer til patogenesen av glaukom. Likeledes kan slike ekstrakter og fluider såvel som andre (blod osv.) anvendes for å diagnostisere eller forutsi steroid sensitivitet.

En rekke forskjellige klasser av polymorfismer kan identifiseres ved hjelp av slike metoder. Eksempler på slike klasser inkluderer: (1) polymorfismer tilstede i TIGR cDNA i forskjellige individer, (2) polymorfismer i ikke-translaterte TIGR gensekvenser inkluderende promoteren eller andre regulerende regioner i TIGR genet, (3) polymorfismer i gener hvis produkter interagerer med TIGR regulerende sekvenser, (4) polymorfismer i gensekvenser hvis produkter interagerer med TIGR proteinet, eller hvortil TIGR proteinet binder.

10

I en alternativ sub-utførelsesform gjennomføres evalueringen ved anvendelse av oligonukleotid "prober" hvis sekvens er komplementær til den i en del av TIGR mRNA. Slike molekyler inkuberes deretter med celleekstrakter fra en pasient under betingelser som er tilstrekkelige til å tillate nukleinsyrehybridisering. For denne sub-utførelsesform er celler fra trabekelverket foretrukket. Deteksjon av dobbeltrådet probe-mRNA hybridmolekyler er en indikasjon på tilstedeværelsen av TIGR mRNA, idet mengden av slikt dannet hybrid er proporsjonal med mengden TIGR mRNA. Slike prober kan således anvendes til å fastslå nivået og omfanget av TIGR mRNA produksjon i en pasients celler. Slik nukleinsyrehybridisering kan gjennomføres under kvantitative betingelser (og derved tilveiebringe en tallverdi på mengden TIGR mRNA tilstede). Alternativt kan analysen gjennomføres som en kvalitativ analyse som indikerer at TIGR mRNA enten er tilstede eller at nivået derav overskrider en brukers angitte, forhåndsbestemte verdi.

De tidligere beskrevne "anti-TIGR antistoffer" kan anvendes i en immundiagnostisk analyse for glaukom og dens relaterte sykdommer.

Som omtalt over utskilles TIGR protein ekstracellulært fra trabekelverket inn i den ekstracellulære matriks til trabekelverket, og det kan således passere ut og inn i kroppsfluidene. Denne egenskap tillater at man kan bestemme TIGR konsentrasjoner i blod, lymfe eller serum, og derved bestemme om en pasients TIGR nivåer overskrider dem som man finner i blodet til individer som ikke har glaukom og som

ikke er pre-disponert for glaukom-relaterte sykdommer eller steroid sensitivitet. Pasienter som blir funnet til å ha endrede nivåer av TIGR kan således diagnostiseres til å ha glaukom.

5

Man kan diagnostisere eller forutsi glaukom, relaterte sykdommer eller steroid sensitivitet ved å bestemme TIGR responsen av celler eller vev annet enn trabekelverket.

- 10 Man kan videre diagnostisere eller forutsi glaukom, relaterte sykdommer og steroid sensitivitet ved å fastslå TIGR respons i en biopsi (eller en makrofag eller annen blodcelleprøve), eller annen celleprøve, eller mere foretrukket i en prøve av kroppsfluid (særlig blod, serum, plasma, tårer osv.). Da
- 15 TIGR genet induseres som svar på tilstedeværelsen av glukokortikoider, er det svært foretrukket å fastslå slik TIGR respons før, under og/eller etter administrering av et glukokortikoid. Som en illustrasjon, skal man nevne at glaukom vil kunne diagnostiseres eller forutsies ved å
- 20 bestemme om administrering av et glukokortikoid (administrert topisk, intraokulært, intramuskulært, systemisk eller på annen måte) endrer TIGR responsen hos et spesielt individ, i forhold til responsen i normale individer. For dette formål vil, mest foretrukket, i det minste en "TIGR gen-induserende
- 25 mengde" av glukokortikoidet tilveiebringes. Som anvendt heri er en TIGR gen-induserende mengde av et glukokortikoid en mengde av glukokortikoid som er tilstrekkelig til å bevirke en påvisbar induksjon av TIGR ekspresjon i celler fra glaukomatøse eller ikke-glaukomatøse individer.

30

- Anti-TIGR antistoffene i henhold til oppfinnelsen kan således anvendes i en immunoassay for å fastslå tilstedeværelse av TIGR. Hvilken som helst av en rekke immunoassay formater kan anvendes for dette formål (Fackrell, J. Clin. Immunoassay
- 35 8:213-219 (1985), Yolken, R.H., Rev. Infect. Dis. 4:35 (1982), Collins, W.P. i: Alternative Immunoassays, John Wiley & Sons, NY (1985), Ngo, T.T. et al., i: Enzyme Mediated Immunoassay, Plenum Press, NY (1985)).

Den enkleste immunoassay involverer kun inkubasjon av et antistoff som er istand til å binde til et forhåndsbestemt targetmolekyl med en prøve som mistenkes for å inneholde targetmolekylet. Tilstedeværelsen av targetmolekylet bestemmes ved tilstedeværelsen, og proporsjonalt med konsentrasjonen, av et hvilket som helst antistoff bundet til targetmolekylet. For å forenkle separasjonen av targetbundet antistoff fra ubundet antistoff som initialt er tilstede, blir typisk en fast fase anvendt. Prøven kan således f.eks. bindes passivt til en fast bærer og, etter inkubasjon med antistoffet, kan bæreren vaskes for å fjerne ethvert ubundet antistoff.

I mere avanserte immunoassays, blir konsentrasjonen av targetmolekylet bestemt ved å binde antistoff til en bærer, og deretter tillate bæreren å komme i kontakt med en prøve som mistenkes for å inneholde targetmolekylet. Targetmolekylet som er blitt bundet til de immobiliserte antistoff kan detekteres på en rekke forskjellige måter. Bæreren kan f.eks. inkuberes i nærvær av et merket, annet antistoff som er istand til å binde til en annen epitop i targetmolekylet. Immobilisering av det merkede antistoff på bæreren krever således tilstedeværelse av target, og er proporsjonalt med konsentrasjonen av target i prøven. I en alternativ analyse, inkuberes target med prøve og med en kjent mengde merket target. Tilstedeværelsen av targetmolekyl i prøven konkurrerer med de merkede targetmolekyler for antistoffbindingssteder. Således er mengden av merkede targetmolekyler som er istand til å binde antistoffet omvendt proporsjonal med konsentrasjonen av targetmolekyl i prøven.

Generelt anvender immunoassayformater enten radioaktive markører ("RIAer") eller enzymmarkører ("ELISAer"). RIAer har fordelene med enkelhet, følsomhet og enkel bruk. Radioaktive markører har en relativt liten atomstørrelse, og påvirker normalt ikke reaksjonskinetikker. Slike analyser lider imidlertid av de ufordelaktigheter at, på grunn av radioisotop nedbrytning, har reagensene en svært kort holdbarhet og krever spesiell behandling og avhending, og

medfører bruk av komplekst og kostbart analyseutstyr. RIAer er beskrevet i *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978)*, med særlig henvisning til kapit-
5 telet med tittel "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" av Chard, T. ELISAer har den fordel at de kan utføres ved anvendelse av billig utstyr, og med en rekke forskjellige enzymer, slik at et stort antall detek-
10 sjonsstrategier, kolorimetrisk, pH, gassutvikling osv., kan anvendes for å kvantifisere analysen. I tillegg har enzymreagensene relativt lang holdbarhetstid, og har ikke risikoen med radioaktiv kontaminering som er forbundet med bruk av RIA. ELISAer er beskrevet i *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (Kemeny, D.M. et al., Eds.), John Wiley & Sons,*
15 NY (1988).

I et alternativt diagnostisk format, kan okulært vev (oppnådd med f.eks. trabekulotomi) evalueres i en in situ immundiagnostisk analyse for glaukom og relaterte sykdommer.

20

I et slikt format blir antistoffer (særlig merkede antistoffer) eller andre TIGR bindingspeptider inkubert i nærvær av okulært vev for å evaluere den kliniske grad og signifikans av glaukom i biopsivev. Omfang, lokalisering eller grad av
25 TIGR i det okulære vev bestemmes ved farging eller ved andre visualiseringsmetoder. Slik informasjon sammenlignes deretter med det merkingsmønster som oppnås fra normale eller glaukomatøse individer for å diagnostisere eller forutsi glaukom.

30

Anti-TIGR antistoffer eller TIGR bindingsmolekyler kan administreres til en pasient og deres evne til å binde til TIGR in vivo kan bestemmes ved okular undersøkelse. Da en slik diagnostisk test er relativt hurtig, er det viktig å
35 merke seg at immunresponser som krever signifikant tid, som den potensielle utløsning av anti-[anti-TIGR] antistoffer eller annen kompleksdannelse av slike antistoffer med anti-TIGR antistoffer, ikke er viktig. I en foretrukket utførelsesform vil antistoffet merkes fluorescerende, og det

gis til en pasient ved injeksjon inn i pasientens sirkulasjonssystem. Antistoffet beveger seg fra sirkulasjonssystemet til det bakre optiske kammer. Kompleksdannelsen av antistoffet med TIGR kan måles ved anvendelse av konvensjonell gonioskopi, eller ved andre passende metoder. En slik analyse tilveiebringer både et middel for å visualisere trabekelverket og et middel for å bestemme omfanget av avsatt TIGR i den ekstracellulære matriks.

10 Som nevnt i det foregående, utviser TIGR protein en evne til selv-aggregering, som i det minste delvis skyldes tilstedeværelsen av leucin-glidelåser i molekylet. Fordi små peptidfragmenter av TIGR som har slike glidelås-regioner kan binde til TIGR, kan slike peptider anvendes som alternativer til
15 anti-TIGR antistoffer i diagnostiske analyser. Bruk av slike peptider er ønskelig da peptidene kan modifiseres til å ha både lipofile og hydrofile grupper. Tilstedeværelsen av slike grupper vil tillate peptidet å traversere korneamembranen. Slike midler kan således gis topisk i form av en
20 øyedråpe eller salve, og kan anvendes på samme måte som anti-TIGR antistoffer til å gjennomføre diagnose av glaukom. Peptidet vil ønskelig være merket med en fluorescerende gruppe for å forenkle deteksjon.

25 Et hvilket som helst passende peptidfragment av TIGR kan anvendes for dette formål, men det er imidlertid foretrukket å anvende et fragment som svarer til hele eller en del av SEQ ID NO:1 rester 85-92, 92-99, 121-128, 128-135, 135-142, 142-149, 149-156, 241-248 og 374-381. Passende lipofile og
30 hydrofile grupper er kjent innen teknikken (se Remington's Pharmaceutical Sciences), og omfatter alifatiske grupper, lipider osv. (lipofile grupper) og organiske syrer, estere, ioniske grupper osv. (hydrofile grupper). Slike grupper kan på enkel måte adderes til TIGR molekylene i henhold til
35 oppfinnelsen ved f.eks. å derivatisere sidekjedegruppene i passende aminosyrer.

Cysteinyllrester kan reageres med α -haloacetater (og tilsvarende aminer), slik som kloreddiksyre eller kloracetamid, til

å gi karboksymetyl eller karboksyamidometylderivater.

Cysteinylrester derivatiseres også ved reaksjon med brom-trifluoracetone, α -brom- β -(5-imidozoyl)propionsyre, klor-acetylfosfat, N-alkylmaleimider, 3-nitro-2-pyridyldisulfid, metyl-2-pyridyldisulfid, p-klorkvikksølvbenzoat, 2-klorkvikk-sølv-4-nitrofenol eller klor-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol.

Histidylrester kan derivatiseres ved reaksjon med dietylprokarbonat ved pH 5,5-7,0 fordi dette middel er relativt spesifikt for histidylsidekjeden. Para-bromfenacylbromid kan også anvendes, idet reaksjonen foretrukket utføres i 0,1 M natrium-kakodylat ved pH 6,0.

Lysinyl og aminoterminale rester kan reageres med ravsyre- eller andre karboksylsyreanhydrider. Derivatisering med disse midler har den effekt av den reverserer forandring i lysinylrestene. Andre passende midler for å derivatisere α -aminoholdige rester inkluderer imidoestere som metylpikolinimidat, pyridoksalfosfat, pyridoksal, klorborhydrid, trinitrobenzensulfonsyre, O-metyllissurea, 2,4-pentandion og transaminase-katalysert reaksjon med glykoxylat.

Arginylrester kan modifiseres ved reaksjon med en eller flere konvensjonelle reagenser, blant dem fenylglyoksal, 2,3-butan-dion, 1,2-cykloheksandion og ninhydrin. Derivatisering av argininrester krever at reaksjonen gjennomføres ved alkaliske betingelser på grunn av den høye pK_a til den guanidin-funksjonelle gruppe. Videre kan disse reagenser reagere med lysingruppene så vel som med arginin-epsilon-aminogruppen.

Karboksylysidegrupper (aspartyl eller glutamyl) kan selektivt modifiseres ved reaksjon med karbodiimider ($R'-N-C-N-R'$) som 1-cykloheksyl-3-(2-morfolinyl-4-etyl)karbodiimid eller 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetylpentyl)karbodiimid. Videre kan aspartyl og glutamylrester omdannes til asparaginyl- og glutaminylrester ved reaksjon med ammoniumioner.

Midlene i henhold til oppfinnelsen kan formuleres i henhold til kjente metoder for å fremstille farmakologisk tålbare

preparater, hvorved disse materialer, eller deres funksjonelle derivater, med den ønskede grad av renhet kombineres i blanding med en fysiologisk tålbart bærer, eksipiens eller stabilisator. Slike materialer er ikke-toksiske for mottageren i de doser og konsentrasjoner som anvendes. Den aktive komponent i slike preparater kan være TIGR protein, TIGR fusjonsproteiner eller fragmenter av TIGR protein eller analoger eller mimetika av slike molekyler. Der nukleinsyremolekyler anvendes, kan slike molekyler være sense, antisense eller tripleks-oligonukleotider av TIGR cDNA eller genet.

Et preparat sies å være "farmakologisk tålbart" dersom administrering derav kan tolereres av en mottakerpasient. Et middel er fysiologisk signifikant dersom dets tilstedeværelse resulterer i en påvisbar forandring i mottagerpasientens fysiologi.

Passende vehikler og deres formulering, inklusive andre humane proteiner, f.eks. humant serumalbumin, er f.eks. beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences (16. utg. Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980)).

Dersom preparatet skal være vannoppløselig, kan det være formulert i en buffer som fosfat eller annet organisk surt salt, foretrukket ved en pH på omtrent 7 til 8. Dersom preparatet kun er delvis oppløselig i vann, kan det fremstilles som en mikroemulsjon ved formulering derav med en ikke-ionisk surfaktant som Tween, Pluronic eller PEG osv., Tween 80, i en mengde på f.eks. 0,04-0,05% (vekt/volum) for å øke oppløseligheten derav. Betegnelsen "vannoppløselig" som anvendt for polysakkaridene og polyetylen glykolene menes å inkludere kolloidale oppløsninger og dispersjoner. Generelt bestemmes oppløseligheten av cellulosederivatene ved graden av substitusjon av etergrupper, og de stabiliserende derivater som er anvendbare heri bør ha en tilstrekkelig mengde av slike etergrupper pr. anhydro-glukoseenhet i cellulosekjeden til å gjøre derivatene vannoppløselige. En grad av etersubstitusjon som er på minst 0,35 etergrupper pr. anhydro-glukoseenhet er generelt tilstrekkelig. I tillegg

kan cellulosederivatene være i form av alkalimetallsalter, f.eks. Li, Na, K eller Cs saltene.

Andre bestanddeler kan eventuelt tilsettes slik som antioksydanter, f.eks. askorbinsyre; polypeptider med lav molekylvekt (mindre enn omtrent ti rester), f.eks. polyarginin eller tripeptider; proteiner som serumalbumin, gelatin eller immunoglobuliner; hydrofile polymerer som polyvinylpyrrolidon; aminosyrer som glycin, glutaminsyre, asparaginsyre eller arginin; monosakkarider, disakkarider eller andre karbohydrater inkluderende cellulose eller dens derivater, glukose, mannose eller dekstriner; chelaterende midler som EDTA; og sukkeralkoholer som mannitol eller sorbitol.

Ytterligere farmasøytiske metoder kan anvendes for å regulere virkningsvarigheten. Preparater med regulert eller forlenget frigivelse kan oppnås gjennom bruken av polymerer for å kompleksdanne eller absorbere det eller de TIGR molekyler i preparatet. Den regulerte tilførsel kan gjennomføres ved valg av passende makromolekyler (f.eks. polyestere, polyaminosyrer, polyvinylpyrrolidon, etylenvinylacetat, metylcellulose, karboksymetylcellulose eller protaminsulfat) og konsentrasjonen av makromolekyler såvel som innlemmelsesmetoder for å regulere frigivelse.

Formuleringer med forlenget frigivelse kan også fremstilles, og inkluderer dannelsen av mikrokapselpartikler og implanterbare gjenstander. For fremstilling av preparater med forlenget frigivelse, blir det eller de TIGR molekyler i preparatet foretrukket innlemmet i en bionedbrytbar matriks eller mikrokapsel. Et passende material for dette formål er et polylaktid, skjønt andre polymerer av poly-(α -hydroksykarboksylsyrer), som poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre (EP 133.988A) kan anvendes. Andre bionedbrytbare polymerer inkluderer poly(laktoner), poly(ortoestere), polyaminosyrer, hydrogeler eller poly(ortokarbonater) poly(acetaler). Det polymere material kan også omfatte polyestere, poly(melkesyre) eller etylenvinylacetat kopolymerer. For eksempler på preparater med forlenget frigivelse, se US patent nr. 3.773.919,

EP 58.481A, US patent nr. 3.887.699, EP 158.277A, kanadisk patent nr. 1176565, Sidman, U. et al., Biopolymers 22:547 (1983) og Langer, R. et al., Chem. Tech. 12:98 (1982).

5 Alternativt, i stedet for innlemmelse av det eller de TIGR molekylene i preparatet i polymerpartikler, er det mulig å innlemme disse materialer i mikrokapsler som f.eks. fremstilles ved coacerverings-teknikker eller ved grenseflatepolymerisering, f.eks. henholdsvis hydroksymetylcellulose-
10 eller gelatinmikrokapsler og poly(metylmetakrylat)mikrokapsler, eller i et tilførselssystem for kolloidalt legemiddel, f.eks. liposomer, albuminmikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler eller i makroemulsjoner. Slike teknikker er angitt i Remington's Pharmaceutical Sciences
15 (1980).

I en alternativ utførelsesform, vil liposomformuleringer og metoder som tillater intracellulært opptak av molekylet anvendes. Passende metoder er kjent innen teknikken, se
20 f.eks. Chicz, R.M. et al. (PCT søknad WO 94/04557), Jaysena, S.D. et al. (PCT søknad WO 93/12234), Yarosh, D.B. (US patent nr. 5.190.762), Callahan, M.V. et al. (US patent nr. 5.270.052) og Gonzalezro R.J. (PCT søknad 91/05771).

25 De farmasøytiske preparater kan steriliseres, som ved filtrering gjennom sterilfiltreringsmembraner (f.eks. 0,2 μm membraner). Preparatene kan lagres i frysetørket form eller som en vandig oppløsning. Det skal forstås at bruk av noen av de ovennevnte eksipienser, bærere eller stabiliseringsmidler vil
30 resultere i dannelsen av salter av molekylene.

Preparatene kan påføres topisk til huden eller til kornea. Ved topisk påføring kan molekylet eller molekylene i preparatet passende kombineres med andre bestanddeler, som bærere
35 og/eller adjuvanter. Der er ingen begrensninger med hensyn til naturen av slike andre bestanddeler, med unntak av at de må være farmasøytisk tålbare og effektive for deres tiltenkte administrering, og de kan ikke svekke aktiviteten til de aktive bestanddeler i preparatet. Eksempler på passende

vehikler inkluderer salver, kremer, geler eller suspensjoner, med eller uten rensset kollagen. Preparatene kan også være impregnert inn i transdermale plastere, og bandasjer, foretrukket i flytende eller halvflytende form.

5

For oppnåelse av en gelformulering, kan det eller de molekyler i preparatet som er formulert i en flytende blanding blandes med en effektiv mengde av et vannoppløselig polysakkarid eller syntetisk polymer som polyetylenglykol til å danne en gel med den rette viskositet for topisk påføring. Polysakkaridet som kan anvendes inkluderer f.eks. cellulosederivater som foretrede cellulosederivater inkluderende alkylcelluloser, hydroksyalkylcelluloser og alkylhydroksyalkylcelluloser, f.eks. metylcellulose, hydroksyetylcellulose, karboksymetylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose og hydroksypropylcellulose, stivelse og fraksjonert stivelse, agar, alginsyre og alginater, gummi arabikum, pullullan, agarose, karrageenan, dekstraner, dekstriner, fruktaner, inulin, mannaner, xylaner, arabinaner, chitosaner, glykogener, glukaner og syntetiske biopolymerer, så vel som gummier som xantangummi, guar gummi, johannesbrødgummi, gummi arabicum, tragantgummi og karayagummi, og derivater og blandinger derav. Det foretrukne geleringsmiddel heri er et som er inert overfor biologiske systemer, ikke-toksisk, enkelt å fremstille og som ikke er altfor rennende eller viskøst, og som ikke vil destabilisere det eller de TIGR molekyler som holdes deri. Polysakkaridet er foretrukket et foretret cellulosederivat, mere foretrukket et som er vel definert, rensset og angitt i USP, f.eks. metylcellulose og hydroksyalkylcellulosederivatene, som hydroksypropylcellulose, hydroksyetylcellulose og hydroksypropylmetylcellulose. Mest foretrukket heri er metylcellulose.

35

Polyetylenglykol som kan anvendes for gelering er typisk en blanding av polyetylenglykoler med lav og høy molekylvekt for å oppnå den rette viskositet. En blanding av f.eks. en polyetylenglykol med molekylvekt 400-600 med en med molekylvekt 1500 ville være effektiv for dette formål når de blandes i det rette forhold for å oppnå en pasta.

Preparatene kan også formuleres for parenteral administrering ved injeksjon, hurtig infusjon, nasofaryngeal absorpsjon (intranasofarangealt), dermo-absorpsjon eller oralt. Preparatene kan alternativt administreres intramuskulært eller intravenøst. Preparater for parenteral administrering inkluderer sterile vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige oppløsningsmidler er propylenglykol, polyetylen glykol, vegetabiliske oljer som olivenolje, og injiserbare organiske estere som etyloljeat. Bærere, tilbehør eller okklusive dressinger kan anvendes til å øke vevspermeabilitet og øke antigen absorpsjon. Flytende doseformer for oral administrering kan generelt omfatte en liposom løsning som inneholder den flytende doseform. Passende former for å suspendere liposomer inkluderer emulsjoner, suspensjoner, oppløsninger, siruper og eliksirer som inneholder inerte fortynningsmidler som vanlig anvendes innen teknikken, som rensset vann. Foruten de inerte fortynningsmidler, kan slike preparater også omfatte fuktmidler, emulgeringsmidler og suspensjonsmidler, eller søtningmidler, smaksmidler, fargestoffer eller parfymemidler.

Dersom metylcellulose anvendes i gelen, utgjør den foretrukket fra omtrent 2-5%, mere foretrukket omtrent 3%, av gelen og det eller de TIGR molekyler i preparatet er tilstede i en mengde på omtrent 300-1000 µg pr. ml gel. Dosen som anvendes er avhengig av de ovennevnte faktorer. Som et generelt forslag, blir det eller de TIGR molekyler i preparatet formulert og avlevert til targetsetet eller targetvevet i en dose som er istand til å etablere, i vevet, en maksimal dose som er effektiv men som ikke er urimelig toksisk.

I den mest foretrukne utførelsesform vil molekylene i henhold til oppfinnelsen tilføres kornea eller overflaten av øyet, og de tillates å adsorbere over kornea inn i det fremre øyekammer. Metoder som kan anvendes for å gjennomføre slik okular medikamenttilførsel er beskrevet av Zun, L.S. (Emerg. Med. Clin. North. Amer. 6:121 (1988)), Lee, V.H. (J. Ocular Pharmacol. 6:157 (1990)), Ellis, P.P. (i: Ocular Therapeutics and Pharmacology, 7th ed., Mosby, (1987)) og (Vaughan, D. et

al., i: General Ophthalmology, Appleton & Lange, Norwalk, CT, s. 213-230 (1992)).

Slik medikamentadministrering vil imidlertid mest foretrukket gjennomføres ved å kombinere effektive mengder av midlene i henhold til oppfinnelsen med et hvilket som helst av de oftalmiske tilførselssystemer med forlenget frigivelse som er beskrevet av Davis, J.P. et al. (US patent nr. 5.192.535).

10 Slike foretrukne topiske oftalmiske medikamentavleverings-systemer med forlenget frigivelse omfatter en vandig suspensjon med en pH fra omtrent 3 til omtrent 6,5 og med et osmotisk trykk fra omtrent 10 til omtrent 400 mOsM som inneholder fra omtrent 0,1 til omtrent 6,5 vekt%, basert på
15 totalvekten av suspensjonen, av en karboksylholdig polymer fremstilt ved polymerisering av en eller flere karboksylholdige monoetylen-umettede monomerer og mindre enn omtrent 5 vekt% av et tverrbindingsmiddel, idet en slik vekt% av monomerer er basert på totalvekten av polymeriserte monome-
20 rer. Ønskelig fremstilles polymeren ved suspensjons- eller emulsjonspolymerisering av monomeren med tverrbindingsmiddel- et til en partikkelstørrelse på høyst omtrent 50 μm , foretrukket høyst omtrent 30 μm , i ekvivalent sfærisk diameter. Suspensjonen har en initial viskositet fra omtrent 1.000 til
25 omtrent 30.000 centipoise (cp) og kan administreres til øyet i dråpeform ved denne initiale viskositet. Polymeren har en gjennomsnittlig partikkelstørrelse på høyst omtrent 50 μm , foretrukket høyst omtrent 30 μm , i ekvivalent sfærisk diameter. Slike polymerer vil generelt ha en molekylvekt som
30 strekker seg fra omtrent 250.000 til omtrent 4.000.000, foretrukket fra omtrent 500.000 til omtrent 2.000.000.

Vandige suspensjoner som inneholder polymerpartikler fremstilt ved suspensjons- eller emulsjonspolymerisering hvis
35 gjennomsnittlige størrelse av tørre partikler er større enn omtrent 50 μm i ekvivalent sfærisk diameter, er mindre bekvemme ved tilførsel til øyet enn suspensjoner som ellers er identiske i sammensetning og som inneholder polymerpartikler hvis ekvivalente sfæriske diameter gjennomsnittlig er under

omtrent 50 μm . Ved en gjennomsnittlig størrelse på over 50 μm , vil dessuten fordelingen med vesentlig økt viskositet etter administrering ikke oppnås.

- 5 Den lett tverrbundne suspensjon kan administreres i dråpeform, og når suspensjonen med den lavere pH bringes i kontakt med øyets tårevæske med høyere pH, vil suspensjonen raskt geleres til en vesentlig større viskositet enn den viskositeten hvormed den opprinnelig ble administrert i dråpeform.
- 10 Den oppnådde mere viskøse gel kan følgelig forbli i øyet i en forlenget tidsperiode for frigivelse av aktivt middel.

Polymeren i det foretrukne intra-okulære medikamenttilførselssystem fremstilles foretrukket fra minst omtrent 50

15 vekt%, mere foretrukket minst omtrent 90 vekt%, av en eller flere karboksylholdige monoetylen-umettede monomerer. Akrylsyre er den foretrukne karboksylholdige monoetylen-umettede monomer, men andre umettede polymeriserbare karboksylholdige monomerer, som metakrylsyre, etakrylsyre, b-metylakrylsyre

20 (krotonsyre), cis-a-metylkrotonsyre (angelinsyre), trans-a-metylkrotonsyre (tiglinsyre), a-butylkrotonsyre, a-fenylakrylsyre, a-benzylakrylsyre, a-cykloheksylakrylsyre, b-fenylakrylsyre (kanelisyre), kumarsyre (o-hydroksykanelisyre), p-hydroksykumarsyre (umbellinsyre), og lignende anvendes i

25 tillegg til eller i stedet for akrylsyre.

Slike polymerer tverrbindnes ved anvendelse av små prosentandeler, dvs. mindre enn omtrent 5%, slik som fra omtrent 0,5% eller fra omtrent 0,1% til omtrent 5%, og foretrukket

30 fra omtrent 0,2% til omtrent 1%, basert på totalvekten av tilstedeværende monomerer, av et polyfunksjonelt tverrbindingsmiddel. Tverrbindingsmidlene i slike preparater inkluderer ikke-polyalkenylpolyeter difunksjonelle tverrbindingsmonomerer som divinylglykol, 2,3-dihydroksyheksa-1,5-dien,

35 2,5-dimetyl-1,5-heksadien, divinylbenzen, N,N-diallylakrylamid, N,N-diallylmetakrylamid og lignende. Et foretrukket tverrbindingsmiddel er divinylglykol. Polyalkenylpolyeter tverrbindingsmidler som inneholder to eller flere alkenyletergrupper pr. molekyl er også inkludert, foretrukket

alkenyletergrupper som inneholder terminale $H_2C=C<$ grupper, fremstilt ved foretring av en flerverdig alkohol som inneholder minst fire karbonatomer og minst tre hydroksylgrupper, med et alkenylhalogenid slik som allylbromid e.l. f.eks.

5 polyallylsukrose, polyallylpentaerytritol e.l., se f.eks. Brown, US patent nr. 2.798.053. Diolefiniske ikke-hydrofile makromere tverrbindingsmidler med molekylvekter fra omtrent 400 til omtrent 8.000, slik som uoppløselige di- og polyakrylater og metakrylater av dioler og polyoler, diisocyanat-

10 hydroksyalkylakrylat- eller metakrylat-reaksjonsprodukter, og reaksjonsprodukter av isocyanat-terminerte prepolymerer avledet fra polyesterdioler, polyeterdioler eller polysilok-

sandioler med hydroksyalkylmetakrylater o.l., kan også anvendes som tverrbindingsmidler, se f.eks. Mueller et al. US

15 patenter nr. 4.192.827 og 4.136.250.

I en foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av topiske oftalmiske tilførselssystemer med forlenget frigivelse, blir de ovennevnte suspensjoner fremstilt og pakket ved ønsket

20 viskositet fra 1.000 til omtrent 30.000 centipoise for administrering til øyet i dråpeform. I en foretrukket tilførselsesmetode, blir de ovennevnte suspensjoner som inneholder medikamentet administrert til øyet ved den initiale viskositet i dråpeform for å bevirke at den tilførte suspensjon ved

25 kontakt med den høyere pH i øyets tårevæske raskt gelerer in situ til en vesentlig større viskositet enn viskositeten til den suspensjon som opprinnelig administreres i dråpeform. Den mere viskøse gel forblir i øyet i en forlenget tidsperiode for å frigi medikamentet, som er innlemmet i den mere

30 viskøse gel som er dannet på øyet, på en måte med forlenget frigivelse.

Det kan være ønskelig å erstatte opp til omtrent 40 vekt% av de karboksylholdige monoetylen-umettede monomerer med en

35 eller flere ikke-karboksylholdige monoetylen-umettede monomerer som kun inneholder fysiologisk og oftalmologisk ufarlige substituentter.

Det ønskede osmotiske trykk oppnås foretrukket ved anvendelse av et fysiologisk og oftalmologisk tålbart salt i en mengde fra omtrent 0,01 vekt% til omtrent 1 vekt%, basert på totalvekten av suspensjonene. Et foretrukket salt er natrium-
5 klorid.

Den dosen som man behøver for å tilveiebringe en effektiv mengde av preparatet vil generelt variere avhengig av slike faktorer som mottagerens alder, tilstand, kjønn og grad av
10 sykdom om noen, og med andre variable faktorer, og kan justeres og bestemmes av en fagkyndig på området. Effektive mengder av preparatene kan variere fra 0,01-1.000 mg/ml pr. dose eller tilførsel, skjønt mindre eller større mengder kan anvendes. For oftalmiske suspensjoner vil de effektive
15 mengder foretrukket være fra omtrent 0,005 vekt% til omtrent 10 vekt%, og mest foretrukket fra omtrent 0,01 vekt% til omtrent 5 vekt%, basert på totalvekten av suspensjonen.

Idet man nå har beskrevet oppfinnelsen på mere generell
20 basis, vil denne belyses nærmere under henvisning til de etterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Kloning av TIGR cDNA

25 For å klonere det viktigste DEX-induserbare cDNA av HTM celler, ble det anvendt en subtraksjons-screeningprosedyre. I slike subtraksjons-screeningmetoder, tillates cDNA molekyler dannet fra en komplett populasjon av celler å hybridisere med et cDNA bibliotek konstruert fra RNA fra forskjellige sub-
30 populasjoner av celler for å identifisere kloner som utviser differensiell ekspresjon og som således reflekterer mRNA molekyler som er induert eller undertrykt i hver populasjon (Lamar, E.E. et al., Cell 37:171-177 (1984), Rubenstein, J.L.R. et al., Nucleic Acids Res. 18:4833-4842 (1990),
35 Hedrik, S.M. et al., Science 308:149-153 (1984), Duguid, J.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5738-5742 (1988), Weiland, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:2720-2724 (1990)).

cDNA ble derfor fremstilt fra mRNA fra humane trabekelverk (HTM) celler som var blitt inkubert i 100 nM deksametason i 10 døgn, såvel som fra mRNA fra ubehandlede HTM celler. cDNA biblioteket ble konstruert i lambda ZapII ved anvendelse av stamme XL-1 (Stratagene, San Diego). Omtrent 30-50 µg mRNA ble oppnådd fra 5×10^7 deksametason-behandlede celler som beskrevet av Nguyen, T.D. et al., (i: "Schriftenreihe de Academie der Wissenschaften under der Litteratur, Mainz", 331-343 (1993)).

10

To uavhengige screeninger av 20.000 fager hver ble gjennomført ved anvendelse av en differensiell screeningprosedyre. Fagene ble probet separat med merket cDNA dannet fra mRNA av ubehandlede celler og av deksametason-behandlede celler i 1 døgn og 10 døgn. Kloner som utviste en induserbar respons (dvs. økt merking ved probing med deksametason-behandlet cDNA i forhold til kontroll cDNA) var de ønskede kandidater for videre analyse.

20

Flere cDNA kloner ble oppnådd som svarer til mRNA dannet i større mengder i deksametason-behandlede celler. Et cDNA klon, svarende til mRNA som var tilstede i de deksametason-behandlede celler, men som var fraværende i de ubehandlede celler, ble betegnet "klon II.2" eller "TIGR" (T.D. Nguyen et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:789 (1991)). Et annet klon kodet for alfa-1-antichymotrypsin.

25

Nivået av disse forandringer ble kvantifisert ved både dot-blot og PCR metoder. I dot-blot analysen, blir DNA fra klonene seriefortynnet og påført på membraner som deretter hybridiseres til merket total cDNA av kontroll, i døgns eller 10 døgns deksametason-behandlede HTM celler. Dot-blot analysen viste at TIGR mRNA var den viktigste induserede type, omfattende 3-4% av total cellulær mRNA på dag 10. Et ikke-signifikant nivå av TIGR mRNA ble detektert i kontrollen. Tidsforløpet for deksametason-behandling i 2, 4, 7 og 10 døgn viste at TIGR induseres progressivt (T.D. Nguyen et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32:789 (1991)). Cykloheksimid-studier viste at induksjonen krevde proteinsyntese. Southern

35

analyse og in-situ hybridisering viste multiple kopitall av genet. For PCR amplifikasjonsanalyse, ble seriefortynning PCR metoden (Chelly, J.D. et al., Eur. J. Biochem. 187:691-698 (1990), Murphy, L.D. et al., Biochem. 29:10350-10356 (1990), Singer-Sam, J.O. et al., Nucl. Acids Res. 18:1255-1259 (1990)) modifisert til å beholde det eksponensielle område av amplifikasjonen gjennom kvantifiseringsprosedyren for å måle og bekrefte den store og progressive induksjon av TIGR mRNA over en 10 døgns deksametason-induksjonsperiode.

10 Kvantitativ PCR analyse viste et induksjonsnivå på omtrent 20 ganger sammenlignet med nivået funnet i celler som var blitt behandlet med deksametason i kun 1 døgn.

Northern analyse viste at klon TIGR var omtrent 2,5 kb, og at det kodet for et protein med unik sekvens. Induksjonen av mRNA krevde proteinsyntese og insulin-lignende vekstfaktor reduserte induksjonseffekten med 50%. TIGR mRNA induksjonen ble ikke observert i deksametasonbehandlede fibroblaster, keratinocytter eller ciliære epitelceller. Induksjons-

20 mønsteret i HTM celler kunne skjernes fra andre steroid-induserte proteiner som metallotionin, alfa₁-syre glykoprotein og TAT som maksimalt ble indusert ved ett døgns deksametasonbehandling. I tillegg til deksametason, ble TIGR mRNA indusert i HTM celler eksponert for hydrogenperoksyd, TPA eller glukose i fra 3-24 timer. Deksametasonbehandling ga

25 vesentlig tap i mRNAer for glukokortikoidreseptorer og varmesjokkproteiner (f.eks. hsp 90 mRNA nivåer falt omtrent 20 ganger etter 10 døgns deksametasonbehandling).

30 Eksempel 2

Ekspresjon av TIGR

En evne til å uttrykke vesentlige mengder TIGR vil forenkle bruken av dette protein for funksjonelle analyser, og utviklingen av anti-TIGR antistoffer. For å oppnå slik økt

35 ekspresjon, ble PVL1393 baculovirusoverføringsvektor fra Invitrogen Corp. anvendt. Et 2 kb Eco-R1 fragment av TIGR cDNA ble innført i Eco R1 kloningssetet i PVL1393. PCR og sekvensanalyse viste at innskuddet var blitt ligert i den korrekte orientering inn i vektorens polyhedrinpromoter.

Kotransfeksjon av denne struktur og viltype baculovirus DNA i Sf9 insektceller ga høye titere av rekombinant protein. Sf9 insektcellelinjen kan oppnås fra American Type Culture Collection, Rockville, MD, US med deponeringsnummer ATCC CRL 5 1711. Metoder for anvendelse av slike vektorer og celler er beskrevet av Summers M.D. et al. (I: A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin nr. 1555 (1987)), og Summer, M.D. (US patent 5.278.050).

10

PCR verifikasjon av disse rekombinanter viste positivt signal for det uttrykte gen. SDS gelanalyse av de SF9 transfekterte celleproteiner viste at det nye produkt hadde en molekylvekt på omtrent 55 kDa og beløp seg til 90-95% av det totalt 15 dannede protein. Disse verdier korrelerte godt med størrelsen på HTM celleproteinet induert ved deksametason (DEX) (Polansky, J.R. et al., Prog Clin Biol Res 312:113-138, 1989) og den beregnede molekylvekt fra den isolerte cDNA sekvens. G-150 (Pharmacia) kolonnerensing og Edman nedbrytnings- 20 sekvensering av proteinet bekreftet den åpne leseramme til TIGR cDNA.

Studier av det rekombinante protein foreslo således (1) at 55 kD proteinet eksisterte både i celler og i mediet, (2) at 25 det undergikk oligomerisering, (3) fosforylering, (4) glykosylering, (5) at det var følsomt overfor metalloprotease, (6) at det utviste høy affinitetsbinding til ekstracellulær matriks og humane trabekelverkceller, (7) at det utviste progressive induksjoner over tid i både cellekulturer og 30 organkulturer, og (8) at det utviste høy ekspresjon i HTM fra glaukomatøse pasienter sammenlignet med normale pasienter. Denne induksjon korrelerte med topiske glukokortikoideffekter på intra-okulart trykk i pasienter, og avvek fra andre kjente glukokortikoid-induksjonsmønstre som utviser nær maksimal 35 induksjon kun en dag etter deksametasonbehandling.

Eksempel 3**Strukturelle egenskaper for TIGR**

Klon TIGR ble sekvensert og funnet til å omfatte et 2,0 kb cDNA molekyl (SEQ ID NO:2). Full-lengde transkriptet var nær
5 2,5 kb som bestemt ved en Northern analyse. cDNA inkluderte to ATG startseter som ga to 55 kD proteiner i både HTM og Sf9 celler. Det større protein var 497 aminosyrer, og er definert ved TIGR åpen leseramme (SEQ ID NO:1). Det større protein skyldes den ubehandlede form av TIGR, og det mindre
10 protein reflekterer den proteolytiske spaltning av TIGR signalpeptidet. Den aminoternale sekvens til disse proteiner er blitt bekreftet ved aminosyresekvensanalyse. Post-translasjonsmodifikasjon av disse proteiner ga også en svært glykosylert TIGR form på omtrent 66 kD.

15
Strukturanalyse av klonet viste at det kodet for et nytt ekstracellulært protein på omtrent 55 kD med et N-glykosyleringssete i SEQ ID NO:1 rester 57-60 og O-glykosyleringsseter i SEQ ID NO:1 rester 221-222, 222-223, 270-272, 305-306,
20 397-401, 453-457, 457-459, heparinsulfatbinding (SEQ ID NO:1 rester 110-113 og 146-150) og initieringsdomener (SEQ ID NO:1 rester 223-224, 231-232 og 324-325), 7 konsensus leucin-glidelås-enheter, som danner to strekninger, en lokalisert i SEQ ID NO:1, rester 85-92 og 92-99, og fem lokalisert i SEQ
25 ID NO:1 rester 121-128, 128-135, 135-142, 142-149 og 149-156, og en potensiell GIP (guanidylinositolfosfat) binding. Det 55 kD rekombinante protein danner dimer eller heteromer i HTM mediet som vist ved tverrbindingstudier, og det kan selv-aggregere. Det rekombinante protein hadde en spesifikk evne
30 til å binde trabekelverkceller ($4,3 \times 10^{-9}$ M og $2,3 \times 10^{-8}$ M) som vist ved Skatchardanalyse. I motsetning til dette viste proteinet ikke-mettbar og lavaffinitets-bindingsevne for fibroblaster. Det rekombinante protein ble vist til å være et substrat for 72 kD metalloproteasen.

35

Anti-TIGR antistoffene gjenkjenner et 66 kD protein i DEX-behandlet HTM medium. Dette protein ble vist til å være en svært glykosylert form av 55 kD TIGR proteinet. Denne konklusjon ble understøttet ved den observasjon at ekspresjon

gjennomført i nærvær av tunicamycin endret produksjon fra 66 kD til 55 kD. 66 kD glykosylert form av TIGR fremkommer til å være et hyaluronat-bindingsprotein, da det ble funnet til å være i stand til å binde til hyaluronsyrekuler. Slike s bindingsproteiner er definert ved deres evne til å binde til slike kuler og til å elueres fra kulene i nærvær av 4 M guanidin etter vaskinger med 0,15 og 1,5 M NaCl.

SEKVENSLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

5

(i) APPLICANT: NGUYEN, THAI D.
POLANSKY, JON R.
HUANG, WEIDONG

10

(ii) TITLE OF INVENTION: METHODS FOR THE DIAGNOSIS
OF GLAUCOMA

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

15

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: HOWREY & SIMON
(B) STREET: 1299 PENNSYLVANIA AVE., N.W.
(C) CITY: WASHINGTON
(D) STATE: D.C.
(E) COUNTRY: US
(F) ZIP: 20004

20

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

25

30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

35

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: AUERBACH, JEFFREY I
(B) REGISTRATION NUMBER: 32,680

40

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (202) 383-7451
(B) TELEFAX: (202) 383-6610

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 497 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

10 (iii) HYPOTHETICAL: NO

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(B) CLONE: TIGR

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

	Met	Arg	Phe	Phe	Cys	Ala	Arg	Cys	Cys	Ser	Phe	Gly	Pro	Glu	Met	Pro	
	1				5					10					15		
20	Ala	Val	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Trp	Asp	Val	Gly	Ala	
				20					25					30			
	Arg	Thr	Ala	Gln	Leu	Arg	Lys	Ala	Asn	Asp	Gln	Ser	Gly	Arg	Cys	Gln	
25			35					40					45				
	Tyr	Thr	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Pro	Asn	Glu	Ser	Ser	Cys	Pro	Glu	Gln	
		50					55					60					
30	Ser	Gln	Ala	Met	Ser	Val	Ile	His	Asn	Leu	Gln	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr	
	65					70					75					80	
	Gln	Arg	Leu	Asp	Leu	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	
					85					90					95		
35	Ser	Leu	Leu	His	Gln	Leu	Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Ala	Arg	Pro	Arg	Arg	
					100				105					110			
	Pro	Arg	Arg	Arg	Glu	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu	Thr	Gln	Thr	Arg	Glu	Leu	
40			115					120					125				
	Glu	Thr	Ala	Tyr	Ser	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp	Lys	Ser	Val	Leu	Glu	Glu	
		130					135					140					
45	Glu	Lys	Lys	Arg	Leu	Arg	Gln	Glu	Asn	Glu	Asn	Leu	Ala	Arg	Arg	Leu	
	145					150					155					150	
	Glu	Ser	Ser	Ser	Gln	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Arg	Gly	Gln	Cys	Pro	
					165					170					175		
50	Ser	Thr	Arg	Asp	Thr	Ala	Arg	Ala	Val	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Glu	Val	
				180					185						190		

Ser Thr Trp Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Gln Glu Leu Lys Ser Glu
 195 200 205
 5 Leu Thr Glu Val Pro Ala Ser Arg Ile Leu Lys Glu Ser Pro Ser Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Ser Gly Glu Gly Asp Thr Gly Cys Gly Glu
 225 230 235 240
 10 Leu Val Trp Val Gly Glu Pro Leu Thr Leu Arg Thr Ala Glu Thr Ile
 245 250 255
 Thr Gly Lys Tyr Gly Val Trp Met Arg Asp Pro Lys Pro Thr Tyr Pro
 260 265 270
 15 Tyr Ile Pro Gly Asp His Val Glu Asn Arg His Ser Trp His Gly Cys
 275 280 285
 20 Pro Pro Val Phe Glu Tyr Asp Leu Ile Ser Gln Phe Met Gln Gly Tyr
 290 295 300
 Pro Ser Lys Val His Ile Leu Pro Arg Pro Leu Glu Ser Thr Gly Arg
 305 310 315 320
 25 Val Val Tyr Ser Gly Ser Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Glu Ser Arg Thr
 325 330 335
 Val Ile Arg Tyr Glu Leu Asn Thr Glu Thr Val Lys Ala Glu Lys Glu
 340 345 350
 30 Ile Pro Gly Ala Gly Tyr His Gly Gln Phe Pro Tyr Ser Trp Gly Gly
 355 360 365
 35 Tyr Thr Asp Ile Asp Leu Ala Val Asp Glu Ala Gly Leu Trp Val Ile
 370 375 380
 Tyr Ser Thr Asp Glu Ala Lys Gly Ala Ile Val Leu Ser Lys Leu Asn
 385 390 395 400
 40 Pro Glu Asn Leu Glu Leu Glu Gln Thr Trp Glu Thr Asn Ile Arg Lys
 405 410 415
 Gln Ser Val Ala Asn Ala Phe Ile Ile Cys Gly Thr Leu Tyr Thr Val
 420 425 430
 45 Ser Ser Tyr Thr Ser Ala Asp Ala Thr Val Asn Phe Ala Tyr Asp Thr
 435 440 445
 50 Gly Thr Gly Ile Ser Lys Thr Leu Thr Ile Pro Phe Lys Asn Arg Tyr
 450 455 460
 Lys Tyr Ser Ser Met Ile Asp Tyr Asn Pro Leu Glu Lys Lys Leu Phe
 465 470 475 480
 55 Ala Trp Asp Asn Leu Asn Met Val Thr Tyr Asp Ile Lys Leu Ser Lys
 485 490 495
 Met

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 1968 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

15 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(B) CLONÉ: IL2

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

25	TTTTNAAGTN CATATCGAAT TCGGNACGAG GNAGAGCTTT CCAGAGGAAG CCTCACCAAG	60
	CCTCTGCAAT GAGGTTCTTC TGTGCACGTT GCTGCAGCTT TGGGCCTGAG ATGCCAGCTG	120
	TCCAGCTGCT GCTTCTGGCC TGCCCTGGTGT GGGATGTGGG GGCCAGGACA GCTCAGCTCA	180
30	GGAAAGCCAA TGACCAGAGT GGCCGATGCC AGTATACCTT CAGTGTGGCC AGTCCCAATG	240
	AATCCAGCTG CCCAGAGCAG AGCCAGGCCA TGTCAGTCAT CCATAACTTA CAGAGAGACA	300
	GCAGCACCCA ACGCTTAGAC CTGGAGGCCA CCAAAGCTCG ACTCAGCTCC CTGGAGAGCC	360
35	TCTCCACCA ATTGACCTTG GACCAGGCTG CCAGGCCAG GAGACCCAGG AGGCGGGAGC	420
	GGGACCAGCT GGAAACCCAA ACCAGAGAGT TGGAGACTGC CTACAGCAAC CTCCPCCGAG	480
40	ACAAGTCAGT TCTGGAGGAA GAGAAGAAGC GACTAAGGCA AGAAAATGAG AATCTGGCCA	540
	GGAGGTTGGA AAGCAGCAGC CAGGAGGTAG CAAGGCTGAG AAGGGGCCAG TGTCCAGTA	600
	CCCGAGACAC TGCTCGGGCT GTGCCACCAG GCTCCAGAGA AGTTTCTACG TGGAAATTTGG	660
45	ACACTTTGGC CTTCACGGAA CTGAAGTCCG AGCTAAGTGA AGTTCCTGCT TCCCGAATTT	720
	TGAAGGAGAG CCATCTGGC TATCTCAGGA GTCTCAGGAG TGGAGAGGGA GACACGGAT	780
50	GTGAGAACT AGTTTGGGTA GGAGAGCCTC TCACGCTGAG AACAGCAGAA ACAATTAAGT	840
	GCAAGTATGG TGTGTGGATG CGAGACCCCA AGCCCACCTA CCCCTACATC CCAGGAGACC	900
	ACGTGGAGAA TCGACACAGT TGGCACGGAT GTCCGCCAGT TTTTGAGTAT GACCTCATCA	960
55	GCCAGTTTAT GCAGGGCTAC CCTTCTAAGG TTCACATACT GCCTAGGCCA CTGSAAGCA	1020

	CGGGTCGTGT GGTGTACTCG GGGAGCCTCT ATTTCCAGGG CGCTGAGTCC AGAACTGTCA	1080
	TAAGATATGA GCTGAATACC GAGACAGTGA AGGCTGAGAA GGAAATCCCT GGAGCTGGCT	1140
5	ACCACGGACA GTTCCCGTAT TCTTGGGGTG GCTACACGGA CATTGACTTG GCTGTGGATG	1200
	AAGCAGGCGT CTGGGTCAAT TACAGCACCG ATGAGGCCAA AGGTGCCATT GTCTCTCCA	1260
10	AACTGAACCC AGAGAATCTG GAACTCGAAC AAACCTGGGA GACAAACATC CGTAAGCAGT	1320
	CAGTGGCCAA TGCCCTCATC ATCTGTGGCA CCTTGTACAC CCTCAGCAGC TACACCTCAG	1380
	CAGATGCTAC CGTCAACTTT GCTTATGACA CAGGCACAGG TATCAGCAAG ACCCTGACCA	1440
15	TCCCATTCAA GAACCGCTAT AAGTACAGCA GCATGATGTA CTACAACCCC CTGGAGAAGA	1500
	AGCTCTTTCG CTGGGACAAC TTGAACATGG TCACTTATGA CATCAAGCTC TCCAAGATGT	1560
20	GAAAAGCCTC CAAGCTGTAC AGGCAATGOC AGAAGGAGAT GCTCAGGGCT CCTGGGGGGA	1620
	GAGGGCTGAA GGCAGAGCCA GCCAGCCAGG GCCCAGGAGC TTTGACTGCT TTCCAAGTTT	1680
	TCAITTAATCC AGAAGGATGA ACATGGTCAC CATCTAACTA TTCAGGAATT GTAGTCTGAG	1740
25	GGCGTAGACC ATTTCAATATA ATAAATATCC TTTATCTTCT GTCAGCATT ATGGGATGTT	1800
	TAATGACATA GTTCAAGTTT TTCTGAAAA CCATTGCTCT TGCAATGTAC ATGGTTACCA	1860
30	CAAGCCACAA TAAAAAGCAT AACTTCTAAA GGAAGCAGAA TAGCTCETCT GGCCAGCATC	1920
	GAATATAAGT AAGATGCATT TACTACAGTT GGCTTCTAAT GCTTCAGA	1968

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

35 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1491 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

40

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

45

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: TIGR coding sequence

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

5	ATGAGGTTCT TCTGTGCAGC TTGCTGCAGC TTTGGGCTG AGATGCCAGC TGCCAGCTG	60
	CTGCTTCTGG CCTGCTGGT GTGGGATGTG GGGGCCAGGA CAGCTCAGCT CAGGAAGGCC	120
	AATGACCAGA GTGGCCGATG CCAGTATACC TTCAGTGTGG CCAGTCCCA TGAATCCAGC	180
10	TGCCAGAGC AGAGCCAGGC CATGTCTAGT ATCCATAACT TACAGAGAGA CAGCAGCACC	240
	CAACGCTTAG AACTGGAGGC CACCAAGCT CGACTCAGCT CCTGGAGAG CCTCCTCCAC	300
15	CAATTGACCT TGGACCAGGC TGCCAGGCC AGGAGACCCA GGAGGCGGA GCGGACCAG	360
	CTGGAACCC AAACCAGAGA GTTGGAGACT GCCTACAGCA ACCCTCTCC AGACAAGTCA	420
	GTCTGGAGG AAGAGAAGAA GCGACTAAG CAAGAAATG AGAATCTGGC CAGGAGGTTG	480
20	GAAAGCAGCA GCCAGGAGGT AGCAAGGCTG AGAAGGGGCC AGTGTCCAG TACCCGAGAC	540
	ACTGTCCGG CTGTGCCACC AGGCTCCAGA GAAGTTTCTA CGTGGAAATP GGACACTTTG	600
25	GCCTTCCAGG AACTGAAGTC CGAGCTAACT GAAGTTCTTG CTTCCTGAAT TTTGAAGGAG	660
	AGCCCATCTG GCTATCTCAG GAGTCTCAGG AGTGGAGAGG GAGACACCG ATGTGGAGAA	720
	CTAGTTTGGG TAGGAGAGCC TCTCAGCTG AGAACAGCAG AAACAATTAC TGGCAAGTAT	780
30	GGTGTGTGGA TGGAGACCC CAAGCCACC TACCCTACA TCCAGGAGA CCAGTGGAG	840
	AATGACACA GTTGGCAGG ATGTCCGCCA GTTTTGTAGT ATGACCTCAT CAGCCAGTTT	900
35	ATGCAGGGCT ACCCTTCTAA GGTTCACATA CTGCCTAGGC CACTGGAAAG CACGGTCTGT	960
	GTGGTGTACT CCGGAGCCT CTATTTCCAG GCGCTGAGT CCAGAACTGT CATAAGATAT	1020
	GAGCTGAATA CCGAGACAGT GAAGGCTGAG AAGGAAATCC CTGGAGCTGG CTACCACGGA	1080
40	CAGTTCOCGT ATTCTTGGGG TGGCTACAG GACATGACT TGGCTGTGA TGAAGCAGGC	1140
	CTCTGGGTCA TTTACAGCAC CGATGAGGCC AAAGGTGCCA TTGTCTCTC CAAACTGAAC	1200
45	CCAGAGAATC TGGAACTCGA ACAAACCTGG GAGACAAACA TCCGTAAGCA GTCAGTCCGC	1260
	AATGCCITCA TCATCTGTGG CACCTGTAC ACCGTCAGCA GCTACACCTC AGCAGATGCT	1320
	ACCGTCAACT TTGCTTATGA CACAGGCACA GGTATCAGCA AGACCTGAC CATCCATTC	1380
50	AAGAACCCTG ATAAGTACAG CAGCATGATT GACTACAACC CCTGGAGAA GAAGCTCTTT	1440
	GCCTGGGACA ACTGAACAT GGTCACTTAT GACATCAAGC TCTCCAAGAT G	1491

PATENTKRAV

1. Hovedsakelig rensset nukleinsyremolekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et 15
5 til 250 nukleotidfragment av et polynukleotid med sekvensen
SEQ ID NO:2 eller SEQ ID NO:3.
2. Nukleinsyremolekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter komple-
10 mentet av et molekyl som angitt i krav 1.
3. Nukleinsyremolekyl som angitt i krav 1 eller 2, hvori
nukleinsyremolekylet omfatter et 250 nukleotidfragment.
- 15 4. Rensset TIGR protein,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det har sekvensen
SEQ ID NO:1 som kodet for av en nukleinsyre som angitt i
krav 1.
- 20 5. Protein,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et
polypeptid med sekvensen SEQ ID NO:1 som kodet for av en
nukleinsyre som angitt i krav 1.
- 25 6. Anti-TIGR antistoff eller et antigen-bindingsfragment
derav, eller et enkelt-kjede antigen-bindingsmolekyl eller
et antigen-bindingsfragment derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er i stand til
spesifikk binding til et rensset TIGR protein med sekvensen
30 SEQ ID NO:1.
7. Antistoff eller antigen-bindingsfragment derav, eller
enkelt-kjede antigen-bindingsmolekyl eller fragment derav
som angitt i krav 6, som er detekterbart merket.
- 35 8. Fremgangsmåte for å diagnostisere glaukom,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter trinnene
med:

inkubasjon under betingelser som tillater nukleinsyre-
hybridisering, av et markør-nukleinsyremolekyl, idet markør-
nukleinsyremolekylet omfatter et TIGR nukleinsyremolekyl som
angitt i ett av kravene 1 eller 2, og et komplementært
5 nukleinsyremolekyl oppnådd fra en celle eller et kroppsfluid
fra en pasient, hvori nukleinsyrehybridisering mellom
markør-nukleinsyremolekylet og det komplementære nuklein-
syremolekylet oppnådd fra pasienten tillater deteksjonen av
en polymorfisme hvis tilstedeværelse indikerer en mutasjon
10 som påvirker sekresjon av et TIGR protein som angitt i ett
av kravene 4 til 5 i pasienten;

tillate hybridisering mellom det TIGR-kodende markør-
nukleinsyremolekylet og det komplementære nukleinsyre-
15 molekylet oppnådd fra pasienten; og

detektere tilstedeværelsen av polymorfismen, hvori detek-
sjonen av polymorfismen er en diagnose av glaukom.

20 9. Fremgangsmåte som angitt i krav 8, hvori mutasjonen som
påvirker sekresjonen av TIGR proteinet påvirker nivået av
TIGR proteinet.

10. Fremgangsmåte som angitt i krav 8, hvori mutasjonen som
25 påvirker sekresjon av TIGR proteinet påvirker mønsteret for
TIGR proteinekspressjonen.

11. Fremgangsmåte som angitt i krav 8-10, hvori kropps-
fluidet er valgt fra gruppen som består av glaukomatøs
30 celleekstrakt, fluid fra det fremre øyekammer, blod, lymfe
og serum.

12. Fremgangsmåte som angitt i krav 8-11, hvori det
komplementære nukleinsyremolekylet oppnådd fra en celle
35 eller tilstede i et kroppsfluid fra pasienten uttrykkes ved
stereoidbehandlede celler.

13. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, hvori kroppsfluidet
er okulært vandig, og hvori cellene er HTM-celler.

14. Fremgangsmåte som angitt i krav 9, hvori det komplementære nukleinsyremolekylet oppnådd fra en celle eller et kroppsfluid fra pasienten er blitt amplifisert ved å anvende en nukleinsyreamplifikasjonsmetode.
- 5
15. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-amplifikasjonsmetoden er polymerasekjedeamplifikasjon.
16. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-
10 amplifikasjonsmetoden er ligasekjedereaksjon.
17. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-amplifikasjonsmetoden er oligonukleotidligeringsanalyse.
- 15 18. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-amplifikasjonsmetoden anvender allel-spesifikke oligomerer.
19. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-amplifikasjonsmetoden er forgrenet DNA teknologi.
- 20
20. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-amplifikasjonsmetoden er transkripsjonsbasert amplifikasjon.
21. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvori nukleinsyre-
25 amplifikasjonsmetoden er iso-termal amplifikasjon.

