



(12) PATENT

(19) NO

(11) 331972

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20024656	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.04.02 PCT/US2001/10719
(22)	Inng.dag	2002.09.27	(85)	Videreføringsdag	2002.09.27
(24)	Løpedag	2001.04.02	(30)	Prioritet	2000.07.26, GB, 0018307 2000.03.31, US, 193905
(41)	Alm.tilgj	2002.11.28			
(45)	Meddelt	2012.05.14			
(73)	Innehaver	Aventis Pharmaceuticals Inc, 55 Corporate Drive, US-NJ08807 BRIDGEWATER, USA Patrice Deneffe, 45, avenue des Fusillés-de-Chateaubriand, F-94100 Saint-Maur, Frankrike June Kaplow, 905 Deerfield Lane, Doylestown, PA 18901, USA Thomas Haws, 250 Sandra Lane, Wilmington, DE 19803, USA Marie Rosier, 21, rue des Baconnets, F-92160 Antony, Frankrike			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Nukleinsyre kodende for Nukleær faktor kB-induserende faktor, protein, ekspresjonsvektor, celle, sammensetning, fremgangsmåte for å evaluere forbindelser, anvendelse for fremstilling av et medikament, samt farmasøytisk sammensetning.			
(56)	Anførte publikasjoner	PAHL, H.L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, Oncogene, 1999, Vol.18, side 6853-6856, MUKHOPADHYAY, A. et al., Identification and Characterization of a Novel Cytokine, THANK, a TNF Homologue That Activates Apoptosis, Nuclear Factor-kappaB, and c-Jun NH2-Terminal Kinase, The Journal of Biological Chemistry, 1999, Vol.274(23), side 15978-15981			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse er rettet mot kjemefaktor kB (NFkB)-induserende faktorpolypeptider (NFIF-polypeptider) som kan indusere NFIC13. Foreliggende oppfinnelse omfatter NFIF-polypeptider, innbefattet NFIF- 14b og NFIF-7a, DNA, innbefattet cDNA, som koder for disse polypeptidene og ekspresjonsvektorer som kan uttrykke NFIF- polypeptider. Videre omfattes fremgangsmåter og preparater for forsterket NFkB- induksjon i en pasient, fremgangsmåter og preparater for redusert NFkB-induksjon i en pasient, fremgangsmåter for inhibering av inflammasjon og fremgangsmåter for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebygging av en NFkB-regulert inflammatorisk respons. I tillegg tilveiebringes fremgangsmåter for fastslåelse av hvorvidt en analyseforbindelse inhiberer eller forsterker aktiviteten av NFIF-polypeptider.

KJERNEFAKTOR κ B-INDUSERENDE FAKTOR

Oppfinnelsens område

Kjernefaktor κ B (NF κ B) omfatter en familie av eukaryote transkripsjonsfaktorer som
 5 deltar i reguleringen av gener som inngår i immunresponser og andre cellulære
 funksjoner. I noen tilfeller fører NF κ B-aktivering til en inflammatorisk respons som til
 syvende og sist resulterer i en sykdomstilstand. Det vil følgelig være ønskelig å utvikle
 midler for kontroll av induksjonen av NF κ B. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer
 polypeptider som deltar i induksjonen av NF κ B og som kan anvendes til å forsterke
 10 NF κ B-ekspresjon eller -aktivering, eller for påvirkning og fremstilling av inhibitorer av
 NF κ B-ekspresjon eller -aktivering.

Teknikkens stand

15 Kjernefaktor κ B (NF κ B) omfatter en familie av transkripsjonsfaktorer som finnes i
 nesten alle eukaryote celler. NF κ B spiller en rolle i regulering av gener som deltar i
 vevsinflammasjon, celleproliferasjon og celledifferensiering.

En rekke undersøkelser har studert sammenhengen mellom sykdomstilstander og
 20 ekspresjon av proteinsubenheten som utgjør NF κ B, eller aktivering av NF κ B som
 allerede foreligger i en celle. Li et al. undersøkte reguleringen av NF κ B ved Tax-
 proteinet fra HTLV-1 og viste at evnen til Tax til å aktivere NF κ B-veien spiller en
 avgjørende rolle ved HTLV-1-indusert celledifferensiering (Li et al., *Gene Expr.*, 7, 4-
 6, 233-245 (1999)). Lentsch og Ward undersøkte aktivering og regulering av NF κ B
 25 under akutt inflammasjon og beskrev sammenhengen mellom NF κ B og de inhiberende
 proteinene fra IK κ B-familien (Lentsch et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 3, 205-208
 (1999)). Visconti et al. undersøkte rollen til NF κ B i tyroid karsinogenese ved å
 analysere tyroid karsinomcellelinjer. Deres undersøkelser tydet på at aktivering av
 NF κ B-komplekset ved overekspresjon av protein p65 spilte en viktig rolle i
 30 tyroidcelletransformasjonsprosessen (Visconti et al., *Oncogene*, 15, 16, 1987-1994
 (1997)). Mukhopadhyay et al. undersøkte ekspresjonen av p50-subenheten i NF κ B-
 transkripsjonsfaktorkomplekset i non-small cell-lungekarsinomvev, og viste at 81% av
 nylig uttatte non-small cell-lungecancervev uttrykker fra 2 til 20 ganger høyere nivå av
 p50-subenheten enn normalt lungevev (Mukhopadhyay et al., *Oncogene*, 11, 5, 999-
 35 1003 (1995)). Khaled et al. påvirket p50-genekspresjonen med spesifikke
 3'-fosforotioatmodifiserte "antisens"-oligodeoksynukleotider og kunne redusere NF κ B-
 ekspresjonen. Deres resultater viste at p50-"antisens"-molekyler kunne redusere NF κ B-

ekspresjonen og nedregulere immunresponsen, noe som gir en mulig behandlingsform for autoimmune forstyrrelser (Khaled et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 83, 3, 254-263 (1997)). Pahl, H.L, *Oncogene*, 1999, Vol.18, side 6853-6856 angir en liste over alle kjente NFκB inducere (Tabell 1) og målgener (Tabell 2). Dataene viser at NFκB generelt fungerer som en sentral regulator av stressreponser, i tillegg vil aktivisering av NFκB blokkere apoptose i mange celletyper. Mukhopadhyay, A. el al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol 274 (23), side 15978-15981 tilveiebringer et nytt cytokine, THANK, dette viser seg å aktivere NFκB gjennom en spesifikk resptor.

10 **Oppsummering av oppfinnelsen**

I samsvar med foreliggende oppfinnelse tilveiebringes nukleinsyresekvenser som koder for kjernefaktor κB induserende faktor (NFIF) 14b og 7a. Videre omfattes cDNA som koder for NFIF-14b og NFIF-7a, og isolerte og rensede NFIF-14b- og NFIF-7a-polypeptider som induserer NFκB. Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelser av isolert NFIF, nukleinsyre som koder for NFIF, vektorer for fremstilling av et medikament samt sammensetninger og farmasøytiske sammensetninger. Eksempler på foretrukne ekspresjonsvektorer er retrovirale vektorer, adenovirusvektorer, adenoassosiert virusvektorer, herpes, herpesvirusvektorer og nakne DNA-vektorer. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også fremgangsmåter for å evaluere testforbindelsers evne til å henholdsvis aktivere eller inhibere aktiviteten til NFIF.

Foreliggende oppfinnelse omfatter nukleinsyre, kjennetegnet ved at den koder for NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid som omfatter en aminosyresekvens som vist SEKV. ID. NR. 1.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også nukleinsyre, kjennetegnet ved at den koder for NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a polypeptid som omfatter en aminosyresekvens som er vist i SEKV. ID. NR. 2.

Videre omfatter oppfinnelsen isolert og rensset NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid, kjennetegnet ved at det induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 1.

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også isolert og rensset NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-7a polypeptid, kjennetegnet ved at det induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 2.

- 5 Ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter en nukleinsyre i følge krav 1 operativt koplet til en kontroll sekvens er også omfattet av oppfinnelsen.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse ekspresjonsvektor, kjennetegnet ved at den omfatter en nukleinsyre i følge krav 2 operativt koplet til en kontroll sekvens.

10

Omfattet er også sammensetning kjennetegnet ved at den omfatter NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid, hvori nevnte polypeptid induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

15

Foreliggende oppfinnelse omfatter sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-7a polypeptid, hvori nevnte polypeptid induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

20

Sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter en antisense nukleinsyre komplementær til en nukleinsyre som koder en NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF- 7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2 er også omfattet av foreliggende oppfinnelse.

25

Videre omfattes sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter et nøytraliserende antistoff som binder til NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF- 7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2 og nedsetter dens aktivitet.

30

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter et ribozym som kutter RNA som koder for NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF-7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2.

35

Foreliggende oppfinnelse omfatter også fremgangsmåte for å evaluere om en testforbindelse er effektiv i å forhindre aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor

Induserende Faktor) -14b basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, kjennetegnet ved at den omfatter:

(A) Sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, (2) det nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og (3) nevnte testforbindelse med nivået av NFκB-regulerte rapportørgen ekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen og

10

(B) fastslå hvorvidt ekspresjonen av rapportørgenet er lavere i den nevnte første prøve relativt til den nevnte andre prøve.

Fremgangsmåte for evaluering av hvorvidt en testforbindelse effektivt inhiberer aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a basert på ekspresjonen av et NFκB-regulert rapportørgen, kjennetegnet ved at den omfatter:

(A) Sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR.2 (2) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgen ekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2 og (5), det nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og

(B) fastslå hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er lavere i den første prøven relativt til den andre prøven er også omfattet av foreliggende oppfinnelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre fremgangsmåte for å fastslå hvorvidt en analyseforbindelse kan forsterke aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -14b basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, kjennetegnet ved at den omfatter:

(A) sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1 (2) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen, og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgen ekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og

35

(B) fastslå om hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er høyere i den nevnte første prøven relativt til den andre nevnte prøven.

Oppfinnelsen omfatter også fremgangsmåte for å identifisere forbindelser som
 5 forsterker aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, kjennetegnet ved at den omfatter:

(A) sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2 og (2) nevnte
 10 NFκB-regulerte rapportørgen, og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgenekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og

15 (B) fastslå av hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er høyere i den nevnte første prøven enn i den nevnte andre prøven.

Omfattet av oppfinnelsen er også anvendelse av et isolert NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID.
 20 NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

Videre er anvendelse av en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID.
 25 NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons omfattet av foreliggende oppfinnelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av en rekombinant vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid
 30 som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

Omfattet av oppfinnelsen er også anvendelse av en defekt, rekombinant viral vektor
 35 som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for

fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av et isolert NFIF(Nukleær Faktor

- 5 Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

- 10 Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

- 15 Anvendelse av en rekombinant vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons er også omfattet av foreliggende oppfinnelse

- 20 Videre omfattes anvendelse av en defekt rekombinant viral vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

25

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er dyrket celle, kjennetegnet ved at den omfatter vektoren i følge krav 8 eller 10.

- 30 Videre omfattes dyrket celle, kjennetegnet ved at den er transfektert med vektoren i følge krav 8 eller 10, hvor cellen uttrykker nevnte polypeptid som omfatter en aminosyresekvens i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2.

- 35 Omfattet av foreliggende oppfinnelse er farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en isolert ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

Farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en rekombinant vektor som omfatter en ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer er også omfattet av den foreliggende oppfinnelse.

5

Foreliggende oppfinnelse omfatter farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en defekt rekombinant vektor som omfatter en ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

10

Celler som har blitt genetisk modifisert *ex vivo* med et rekombinant virus eller fremstilling av celler som inneholder slike rekombinante virus som er implantert i kroppen, og som muliggjør langvarig, effektiv ekspresjon *in vivo* av et NFIF-polypeptid kan anvendes.

15

To sekvenser som viser likheter med polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse er tilgjengelige i nukleinsyresekvensbiblioteket GenBank. Den første sekvens som har aksesjonsbetegnelse Y08135, koder for et peptid som er angitt å være fullengde sur sfingomyelinaseliknende fosfodiesterase 3a fra mus. Den andre sekvensen som har aksesjonsbetegnelse Y08136, koder for en partiell, human klon (863 bp av hvilke 536 er kodende) for en proteinsekvens angitt å være human sur sfingomyelinaseliknende fosfodiesterase 3a. Begge sekvenser ble innlevert 17. september 1996 av K. Hofmann. Selv om begge disse sekvensene ble angitt å kode for sure sfingomyelinaseliknende fosfodiesteraser har denne type enzymatisk aktivitet ikke blitt bekreftet. Disse sekvensene kan ha blitt angitt å være sure sfingomyelinaseliknende fosfodiesteraser grunnet likheter mellom disse proteinenes 3'-sekvenser og den 3'-sekvens til medlemmer av sfingomyelinase-familien.

25

Kort beskrivelse av figurene

30

Figur 1 er aminosyresekvensen til NFIF-14b.

Figur 2 er aminosyresekvensen til NFIF-7a.

Figur 3 er cDNA-sekvensen til NFIF-14b og NFIF-7a, sammenstilt for sammenlikningens skyld.

35

Figur 4 er en skjematisk fremstilling av NFIF-14b og NFIF-7a.

Figur 5 er et søylediagram som viser luminometertellinger pr./sekund observert i HeK 293-celler etter 48 timer.

Figur 6 er et søylediagram som viser luminometertellinger pr./sekund observert i Cos-7-celler etter 48 timer.

Figur 7 er aminosyresekvensen til en sekvens med 15 aminosyrerester som ble anvendt for fremstilling av antistoffer rettet mot NFIF.

5 Figur er et northern-blot med en NFIF-probe.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer polypeptider som kan indusere NFκB, så vel
10 som forbindelser og preparater som kan inhibere induksjon av NFκB.

Foreliggende oppfinnelse er delvis basert på oppdagelsen av NFκB-induserende faktor (NFIF)-proteiner. To funksjonelle varianter av NFIF-proteinet har blitt påvist. En variant, NFIF-14b, omfatter fullengde NFIF. Den andre varianten, NFIF-7a, antas å
15 være en spleisevariant av NFIF-14b. Både NFIF-14b og NFIF-7a har evnen til å indusere en NFκB.

NFκB omfatter en familie av eukaryote transkripsjonsfaktorer som regulerer gener som deltar i immunresponser og andre cellulære aktiviteter. I visse situasjoner kan det være
20 ønskelig å indusere NFκB for å innlede eller øke omfanget av immunrespons. I andre situasjoner kan det være ønskelig å redusere eller forhindre NFκB-induksjon for å redusere eller forhindre en NFκB-regulert immunrespons. Det har for eksempel blitt oppdaget at NFIF er forbundet med en rekke sykdomstilstander forbundet med NFκB-regulerte immunresponser, innbefattet aterosklerose. Ved å inhibere ekspresjonen av
25 NFIF-genet eller på annet vis forstyrre aktiviteten til NFIF-proteinet, er det mulig å inhibere NFκB-induksjon, hvorved NFκB-regulerte inflammatoriske responser som hører til aterosklerose og andre sykdommer kan inhiberes eller forhindres.

Oppdagelsen av genet som koder for NFIF og evnen til å fremstille NFIF-proteiner
30 forenkler påvisning og fremstilling av forbindelser og preparater som kan inhibere aktiviteten av NFIF-proteiner og derved inhibere NFκB-induksjon.

Den påfølgende beskrivelse begynner med en seksjon med definisjoner, fulgt av bakgrunnsinformasjon vedrørende NFκB. Dette følges av en diskusjon av NFIF-
35 polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse, så vel som informasjon vedrørende isolering av DNA som koder for slike polypeptider og fremgangsmåter for fremstilling av varianter av polypeptidene. Ekspresjonsvektorer som kan uttrykke DNA som koder

for NFIF-polypeptidet, diskuteres så, innbefattet informasjon vedrørende egnede promotere for ekspresjonssystemene, fremgangsmåter for innføring av ekspresjonsvektorene i egnede vertsceller, og viral vektorsystemer. Etter denne diskusjonen av NFIF-polypeptider og deres varianter, kommer en diskusjon av terapeutiske anvendelser av NFIF-polypeptider. Denne diskusjonen følges av en beskrivelse av preparater som er anvendbare ved utførelse av foreliggende oppfinnelse. Denne følges av en diskusjon som skisserer de forskjellige terapeutiske preparater og forbindelser, innbefattet polypeptider som bygger på NFIF, "antisens"-nukleinsyrer, ribozymmer og antistoffer. Endelig beskrives fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse som anvender de beskrevne forbindelser og preparater.

Definisjoner

Begrepet "NFIF" anvendes som betegnelse på "kjernefaktor κ B-induserende faktor".

Begrepene "indusere" eller "induksjon" anvendt som beskrivelse av NFIF-aktivitet omfatter evnen til å gi ekspresjon av proteinsubenheter som utgjør NF κ B, enten direkte eller indirekte, så vel som evnen til å aktivere NF κ B som allerede foreligger i en celle. Denne aktiveringen kan være direkte eller indirekte og fører til at NF κ B fungerer som en transkripsjonsfaktor.

For den foreliggende beskrivelses formål kan begrepet "nukleotidsekvens" anvendes for å betegne enten et polynukleotid eller en nukleinsyre. Uttrykket "nukleotidsekvens" dekker selve det genetiske materiale, og er derfor ikke begrenset til informasjonen som er forbundet med sekvensen.

Begrepene "nukleinsyre", "polynukleotid", "oligonukleotid" eller "nukleotidsekvens" dekker RNA-, DNA-, gDNA- eller cDNA-sekvenser eller alternativt RNA/DNA-hybridsekvenser omfattende mer enn ett nukleotid, enten i enkelttrådet form eller i dobbelttrådet dupleksform.

En "nukleinsyre" er en polymer forbindelse som består av kovalent sammenbundne subenheter som kalles for nukleotider. Nukleinsyre omfatter polyribonukleinsyre (RNA) og polydeoksyribonukleinsyre (DNA), som begge kan være enkelttrådet eller dobbelttrådet. DNA omfatter cDNA, genomisk DNA, syntetisk DNA og semisyntetisk DNA. Sekvensen av nukleotider som koder for et protein kalles "sense"-sekvensen eller den kodende sekvens.

Begrepet "nukleotid" betegner både de naturlige nukleotider (A, T, G, C) og modifiserte nukleotider som omfatter minst en modifikasjon, for eksempel (1) en purinanalog, (2) en pyrimidinanalog eller (3) en sukkeranalog, hvor eksempler på slike modifiserte
5 nukleotider for eksempel beskrives i PCT-patentsøknad nr. WO 95/04064.

For foreliggende oppfinnelses formål anses et første polynukleotid å være "komplementært" til et andre polynukleotid dersom hver av basene i det første nukleotid er paret med den komplementære base i det andre polynukleotid, hvis
10 orientering er reversert. De komplementære basene er A og T (eller A og U), eller C og G.

"Heterologt" DNA viser til DNA som ikke naturlig forekommer i cellen eller i et kromosomalt sete i cellen. Det heterologe DNA omfatter fortrinnsvis et gen som er
15 fremmed for cellen.

Som anvendt heri viser begrepet "homolog" i alle sine grammatiske former og stavemåter, til sammenhengen mellom proteiner som besitter et "felles evolusjonært opphav", innbefattet proteiner fra superfamilier (for eksempel immunglobulin
20 superfamilien) og homologe proteiner fra forskjellige arter (for eksempel myosin-lettkjede og så videre) (Reeck et al., *Cell*, 50:667 (1987)). Slike proteiner (og gener som koder for dem) har sekvenshomologi, gjenspeilet i deres høye grad av sekvenslikhet.

Følgelig viser begrepet "sekvenslikhet" i alle sine grammatiske former til graden av
25 identitet eller samsvar mellom nukleinsyre- eller aminosyresekvensene til proteiner som enten har eller ikke har et felles evolusjonært opphav (*se* Reeck et al., *supra*). Som begrepet vanligvis brukes, og i den foreliggende patentsøknad, kan imidlertid begrepet "homolog" når det modifiseres med et adverb som "svært" vise til sekvenslikhet og ikke til et felles evolusjonært opphav.

30 I en spesifikk utførelse er to DNA-sekvenser "i det vesentlige homologe" eller "i det vesentlige like" dersom minst tilnærmet 50% (fortrinnsvis minst tilnærmet 75%, mer foretrukket minst tilnærmet 90% eller 95%) av nukleotidene er like over den definerte lengde av DNA-sekvensene. Sekvenser som i det vesentlige er homologe, kan påvises
35 ved å sammenlikne sekvensene ved anvendelse av standard programvare som er tilgjengelig i sekvensdatabaser, eller i et southern-hybridiseringeksperiment under, for eksempel stringente betingelser som definert for det angjeldende system. Det å definere

egnede hybridiseringsbetingelser ligger innenfor teknikkens stand. Se for eksempel Maniatis et al., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982); Glover et al., *DNA Cloning: A Practical Approach, volumes I and II Oligonucleotide Synthesis*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. (1985); Hames og
 5 Higgins, Hames BD og Higgins SJ, 1985. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, Hames og Higgins red., IRL Press, Oxford (1985).

I en spesiell utførelse er på tilsvarende måte to aminosyresekvenser ”i det vesentlige homologe” eller ”i det vesentlige like” dersom flere enn 30% av aminosyrene er
 10 identiske eller dersom flere enn tilnærmet 60% likner hverandre (er funksjonelt identiske). Like eller homologe sekvenser på vises fortrinnsvis ved sammenstilling, for eksempel ved anvendelse av programmet pileup fra GCG (Genetics Computer Group, programhåndbok for GCG-pakken, versjon 7, Madison, Wisconsin).

15 ”Prosent identitet” mellom to nukleotidsekvenser eller aminosyresekvenser kan for foreliggende oppfinnelses formål bestemmes ved å sammenlikne to sekvenser som er optimalt sammenstilt via et sammenlikningsvindu.

Den del av nukleotidsekvensen eller polypeptidsekvensen som ligger i
 20 sammenlikningsvinduet, kan således omfatte addisjoner delesjoner (for eksempel ”gap”) sammenliknet med referansesekvensen (som ikke omfatter disse addisjonene eller delesjonene), slik at det oppnås en optimal sammenstilling av de to sekvensene.

Prosent identitet beregnes ved å bestemme antall posisjoner hvori en identisk base eller
 25 en identisk aminosyrerest observeres i de to sekvensene (nukleinsyresekvensene eller peptidsekvensene) som sammenliknes og deretter dividere antall posisjoner hvori det er identitet mellom to baser eller aminosyrerester med det totale antall posisjoner i sammenlikningsvinduet, og deretter multiplisere resultatet med 100 for å oppnå prosentsekvensidentitet.

30 Den optimale sekvenssammenstilling som benyttes i sammenlikningen kan oppnås ved å anvende en datamaskin og ved hjelp av kjente algoritmer som inngår i programpakken fra selskapet WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

35 Som en illustrasjon vil det bli mulig å beregne prosent sekvensidentitet ved hjelp av programvaren BLAST (versjonene BLAST 1.4.9 fra mars 1996, BLAST 2.0.4 fra

februar 1998 og BLAST 2.0.6 fra september 1998), ved utelukkende å anvende standard parametere (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). Blast leter etter sekvenser som likner/er homologe med en "søke"-sekvens som referanse, ved hjelp av algoritmen til Altschul et al.

- 5 Søkesekvensen og de anvendte databaser kan være av peptidtype eller nukleinsyretype, hvor enhver kombinasjon er mulig.

Begrepet "tilsvarer" benyttes heri for å vise til like eller homologe sekvenser, uansett om den eksakte posisjon er identisk eller ikke med molekylet som likhet eller homologi måles i forhold til. En sammenstilling av nukleinsyre- eller aminosyresekvenser kan 10 omfatte gap. Begrepet "tilsvarer" viser således til sekvenslikheten, og ikke til nummereringen av aminosyrerester eller nukleotidbaser.

En "variant" av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen vil forstås å bety en nukleinsyre som avviker i en eller flere baser fra referansopolynukleotidet. En nukleinsyrevariant kan 15 være av naturlig opphav, for eksempel en allelisk variant som foreligger naturlig, eller den kan være en ikkenaturlig variant som er erholdt ved for eksempel mutageneseteknikker.

20 Generelt er forskjellene mellom referansenukleinsyren (generelt villtype nukleinsyre) og nukleinsyrevarianten små, slik at nukleotidsekvensen til referansenukleinsyren og sekvensen til nukleinsyrevarianten er svært like, og i mange områder identiske. Nukleotidmodifikasjonene som foreligger i en nukleinsyrevariant kan være tause, hvilket betyr at de ikke endrer aminosyresekvensen som kodes av den varierte 25 nukleinsyren.

Endringene i nukleotider i en nukleinsyrevariant kan imidlertid også føre til substitusjoner, addisjoner eller delesjoner i polypeptidet som kodes av nukleinsyrevarianten, relativt til polypeptidene som kodes av referansenukleinsyren. I 30 tillegg kan nukleotidmodifikasjoner i de kodende områder i konservative eller ikkekonservative substitusjoner i polypeptidets aminosyresekvens.

Nukleinsyrevariantene ifølge oppfinnelsen koder fortrinnsvis for polypeptider som i det vesentlige bevarer samme funksjon eller biologiske aktivitet som polypeptidet fra 35 referansenukleinsyren, eller alternativt evnen til å gjenkjennes av antistoffer som er rettet mot polypeptidene som kodes for den opprinnelige referansenukleinsyre.

Noen nukleinsyrevarianter vil således kode for muterte former av polypeptidene, og en systematisk undersøkelse av disse vil gjøre det mulig å utlede strukturaktivitetssammenheng for proteinene det gjelder. Kjennskap til disse variantene i relasjon til den undersøkte sykdom er avgjørende siden dette gjør det mulig å forstå
 5 sykdomstilstandens molekylære årsak.

- "Fragment" vil forstås å bety en nukleotidsekvens med redusert lengde relativt til referansenukleinsyren, og omfatter over den felles del en nukleotidsekvens som er identisk med referansenukleinsyren. Et slikt nukleinsyre-"fragment" ifølge
 10 oppfinnelsen, kan om ønskelig inngå i et større polynukleotid som det er en bestanddel av. Slike fragmenter omfatter, eller alternativt består av, oligonukleotider med lengde fra 8, 10, 12, 15, 18, 20 til 25, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000 eller 1500 på hverandre følgende nukleotider fra en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen.
- 15 Et "nukleinsyremolekyl" viser til den polymere fosfatestereform av ribonukleosider (adenosin, guanosin, uridin eller cytidin; "RNA-molekyler") eller deoksyribonukleotider (deoksyadenosin, deoksyguanosin, deoksytymidin eller deoksytytidin; "DNA-molekyler"), eller hvilke som helst fosfoesteranaloger av disse, for eksempel fosforotioater og tioestere, enten i enkelttrådet form eller som en
 20 dobbelttrådet heliks. Dobbelttrådet DNA-DNA-, DNA-RNA- og RNA-RNA-helikser er mulige. Begrepet nukleinsyremolekyl, nærmere bestemt DNA- eller RNA-molekyl, viser til molekylets primærstruktur og sekundærstruktur, og er ikke begrenset til spesielle tertiære former. Begrepet omfatter således dobbelttrådet DNA som foreligger i blant annet, lineære eller sirkulære DNA-molekyler (for eksempel
 25 restriksjonsfragmenter), plasmider og kromosomer. Ved diskusjon av strukturen av gitte dobbelttrådet DNA-molekyler, kan sekvenser beskrives heri ut fra den sedvanlige konvensjon at kun sekvensen i 5' til 3' retning langs den ikketranskriberte DNA-tråd gis (dvs. tråden med en sekvens som er homolog med sekvensen til mRNA). Et "rekombinant DNA-molekyl" er et DNA-molekyl som har gjennomgått en
 30 molekylærbiologisk manipulasjon.

Et nukleinsyremolekyl kan "hybridisere" til et annet nukleinsyremolekyl, for eksempel et cDNA, genomisk DNA eller RNA, dersom den enkelttrådet form av nukleinsyremolekylet kan hybridisere til andre nukleinsyremolekyl under egnede
 35 betingelser når det gjelder temperatur og ionestyrke i løsningen (se Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)). Betingelsene når det gjelder temperatur og

ionestyrke bestemmer hybridiseringens "stringens". For en foreløpig analyse av homologe nukleinsyrer, kan hybridiseringsbetingelser med lav stringens, tilsvarende T_m på 55 °C, anvendes, (for eksempel 5 x SSC, 0,1% SDS, 0,25% melk og uten formamid, eller 30% formamid, 5 x SSC, 0,5% SDS). Hybridiseringsbetingelser med moderat stringens tilsvarer en høyere T_m , for eksempel 40% formamid med 5 x eller 6 x SSC. Hybridiseringsbetingelser med høy stringens tilsvarer den høyeste T_m , for eksempel 50% formamid og 5 x eller 6 x SSC. Hybridisering krever at de to nukleinsyrene inneholder komplementære sekvenser, selv om mistilpasning mellom basene er mulig, avhengig av hybridiseringens stringens. Den egnede stringens for hybridisering av nukleinsyrer avhenger av nukleinsyrenes lengde og grad av komplementaritet, variabler som er velkjente innen faget. Jo større grad av likhet eller homologi mellom to nukleotidsekvenser, jo høyere verdi for T_m for hybrider av nukleinsyrer med disse sekvensene. Den relative stabilitet (tilsvarende høyere T_m) for nukleinsyrehybridiseringer avtar i følgende rekkefølge RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. For hybrider som er mer enn 100 nukleotider lange, har det blitt utledet likninger for beregning av T_m (se Sambrook et al., *supra*, 9.50-0.51). For hybridisering med kortere nukleinsyrer, for eksempel oligonukleotider, blir posisjonen for mistilpassede baser mer viktig, og oligonukleotidets lengde bestemmer dets spesifisitet (se Sambrook et al., *supra*, 11.7-11.8). En minimal lengde for en hybridiserbar nukleinsyre er fortrinnsvis minst tilnærmet 10 nukleotider, fortrinnsvis minst tilnærmet 15 nukleotider og mer foretrukket er lengden minst tilnærmet 20 nukleotider.

I en spesifikk utførelse viser begrepet "standard hybridiseringsbetingelser" til en T_m på 55 °C og benytter betingelser som beskrevet ovenfor. I en foretrukket utførelse er T_m 60 °C, og i en mer foretrukket utførelse er T_m 65 °C.

"Hybridiseringsbetingelser med høy stringens" vil for foreliggende oppfinnelses formål forstås å omfatte følgende betingelser:

1-membranblokkering og PREHYBRIDISERING:

- Bland: 40 µl laksemelke-DNA (10mg/ml)
+ 40 µl DNA fra human placenta (10 mg/ml)
- Denaturer i 5 minutter ved 96 °C, sett blandingen på is.
- Fjern 2 x SSC og hell 4 ml formamidblanding i hybridiseringsrøret inneholdende membranene.
- Tilsett blandingen av de to denaturerte DNA.
- Inkuber ved 40 °C i 5 til 6 timer under rotasjon.

2-blokkering av repeterte sekvenser i den merkede probe:

- Den merkede og rensede probe tilsettes 10 til 50 µl Cot I DNA, avhengig av mengden repetisjoner.

5 -Denaturer i 7 til 10 minutter ved 95 °C.

-Inkuber ved 65 °C i 2 til 5 timer.

3-HYBRIDISERING:

-Fjern prehybridiseringsblandingen.

10 - Bland 40 µl laksemelke-DNA + 40 µl DNA fra human placenta, denaturer i 5 minutter ved 96 °C og sett på is.

-Hybridiseringsrøret tilsettes 4 ml formamidblanding, blandingen av de to DNA og den denaturerte blanding av merket probe og Cot I-DNA.

-Inkuber i 15 til 20 timer ved 42 °C under rotasjon.

15

4-Vask og eksponering:

-En vask ved romtemperatur i 2 x SSC for rensing.

-To ganger 5 minutter ved romtemperatur i 2 x SSC og 0,1% SDS ved 65 °C.

-To ganger 15 minutter ved 65 °C 1 x SSC og 0,1% SDS ved 65 °C.

20 -Pakk membranene inn i klar plastfolie og legg på røntgenfilm.

Hybridiseringsbetingelsene beskrevet ovenfor er tilpasset hybridisering under betingelser med høy stringens av et nukleinsyremolekyl med en lengde som varierer fra 20 nukleotider til flere hundre nukleotider. Det er unødvendig å si at

25 hybridiseringsbetingelsene beskrevet ovenfor kan justeres som en funksjon av lengden av nukleinsyren hvis hybridisering ønskes, eller av typen merking som er valgt, ifølge teknikker som er velkjente blant fagfolk. Egnede hybridiseringsbetingelser kan for eksempel justeres ut fra den lære som inngår i håndboken til Hames og Higgins (1985), *supra*, eller i håndboken til F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*,
30 Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Kjernefaktor κB

Kjernefaktor κB (NFκB) utgjør en familie av eukaryote transkripsjonsfaktorer. NFκB-
35 transkripsjonsfaktorene ble først påvist som faktorer som bindes til enhancerelementene i κ-lettkjede-genet i B-lymfocytter fra mus. Påfølgende undersøkelser viste at NFκB

finnes i nær sagt alle celler og regulerer gener som inngår i vevsinflammasjoner, celleproliferasjon og celledifferensiering.

NF κ B omfatter minst fem subenheter: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel og RelB som kan danne homo- og heterodimerer i forskjellige kombinasjoner. Aktive former av NF κ B er vanligvis heterodimerer som består av p65 (RelA) og p50.

I de fleste celler foreligger NF κ B som en inaktiv heterodimer som er oppbundet i cytosol grunnet assosiasjon med et inhiberende protein, I- κ B. Som en respons på stimuli, for eksempel inflammatoriske stimuli, vil I- κ B-proteinet fosforyleres og degraderes, noe som fører til disosiering av I- κ B-NF κ B-komplekset og overføring av NF κ B til kjernen. Når NF κ B først foreligger i kjernen, vil proteinet gjenkjenne spesifikke enhancerseter som inneholder NF κ B-DNA-bindingsmotivet og interagere med basale transkripsjonsfaktorer for start av en RNA polymerase II-formidlet transkripsjon sammen med det TATA-bindende protein. Som nevnt ovenfor, fører dette til transkripsjon av bredt urvalg av gener, særlig gener som inngår i immunresponser og inflammatoriske responser.

Som nevnt ovenfor bygger foreliggende oppfinnelse delvis på oppdagelsen av kjernefaktor κ B-induserende faktor (NFIF)-proteiner. Disse proteinene deltar ved induksjon av NF κ B. Oppdagelsen av disse NFIF-proteinene muliggjør forskjellige tilnærminger for behandling av tilstander som omfatter NF κ B-regulerte inflammatoriske responser. NF κ B-regulerte inflammatoriske responser er forbundet med en rekke sykdomstilstander, som omfatter, men ikke er begrenset til reumatoid artritt, aterosklerose, autoimmune sykdommer, virussykdommer, NSAID-indusert gastropati, neurodegenerative sykdommer, skrapesyke, sepsis, apoptose, Chrons sykdom, nyresykdom, restenose, hjerneskade/inflammasjon, Alzheimers sykdom, astma og feilregulert ekspresjon av pleiotrope cytokiner. I situasjoner hvor det er ønskelig å forhøye induksjonen av et NF κ B med den hensikt å oppnå en forsterket immunrespons, kan NFIF-proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse innføres eller uttrykkes i en pasient for induksjon av NF κ B. Dersom det på den annen side er ønskelig å inhibere induksjonen av NF κ B for å inhibere eller forhindre en immunrespons, kan tilveiebringelsen ifølge foreliggende oppfinnelse av de genetiske sekvenser som koder for NFIF-proteinene og av hvordan disse proteinene kan fremstilles, anvendes for å finne forbindelser og preparater som inhiberer eller forhindrer ekspresjon av NFIF-proteinene, eller som interagerer med NFIF-proteiner, slik at deres aktivitet inhiberes eller forhindres.

Kjernefaktor κ B-induserende faktor (NFIF)-proteiner

Polypeptidene og proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter rekombinante polypeptider, naturlige polypeptider eller syntetiske polypeptider, og disse kan ha sitt
 5 opphav i mennesker, kaniner eller andre dyr.

Polypeptidene kan være isolert fra naturlige kilder, for eksempel placentaekstrakter, humant plasma eller kondisjonert medium fra dyrkede celler, ved anvendelse av rensfremgangsmåter som er kjente blant fagfolk.

10

Alternativt kan polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles ved å benytte rekombinant DNA-teknologi, som omfatter å innføre en nukleinsyre som koder for polypeptidet i en egnet vektor, innføre den resulterende vektor i en egnet vertscelle, gjenvinne polypeptidet som dannes av den resulterende vertscelle, og rense det
 15 gjenvunne polypeptid.

Polypeptidene særpreges ved en reproducerbar, enkel molekylvekt og/eller et sett av flere molekylvekter, kromatografiske egenskaper og elueringsprofiler, aminosyresammensetning og -sekvens, og biologisk aktivitet.

20

Isolering av nukleotidsekvenser som koder for NFIF-polypeptider

NFIF-14b- og NFIF-7a-utførelsene av foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved en rekke egnede fremgangsmåter som er kjente blant fagfolk. Beskrivelser vedrørende
 25 generell molekylærbiologi, mikrobiologi og rekombinant DNA-teknikker innenfor teknikkens stand forklares fullt ut i litteraturen. Se for eksempel Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. utg. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (heri betegnet "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, bind I og II (D.N. Glover red. 1985);
 30 F.M. Ausubel et al. (red.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

cDNA-sekvensen for NFIF-14b og NFIF-7a gis i figur 3. NFIF-7a er en spleisevariant av NFIF-14b. Begrepet "spleisevariant" viser til et polypeptid som kodes av et mRNA
 35 som er dannet ved alternativ prosessering av fullengde-mRNA som kodes av et eller flere gener, noe som gir et mRNA som inneholder en eller flere delesjoner, sammenliknet med fullengde-mRNA fra genene. Som vist i figur 4 har NFIF-7a

sammenliknet med NFIF-14b en intern delesjon av baseparene 473 til 739. Ut fra informasjonen som gis i beskrivelsen heri vedrørende DNA-sekvensen til NFIF-14b- og NFIF-7a og de kjente metodene innen faget for erholdelse av cDNA, kan nukleotidsekvenser som koder for NFIF-14b- og NFIF-7a lett klones og innsettes i en egnet vektor for ekspresjon av disse proteinene *in vitro* eller *in vivo*. For en beskrivelse av fremgangsmåter som gjelder kloning av cDNA og ekspresjonsvektorer, se Sambrook et al., 1989, *supra*. En "kloningsvektor" er et replikon, for eksempel et plasmid, en bakteriofag eller et cosmid, til hvilket et annet DNA-segment kan være koblet slik at det oppnås replikasjon av det tilkoblede segment. Et "replikon" er ethvert genetisk element (for eksempel plasmid, kromosom, virus) som fungerer som en autonom DNA-replikasjonsenhet *in vivo*, dvs. at det kan replikeres under egen kontroll. En kloningsvektor kan være i stand til å replikeres i en celletype og uttrykkes i en annen ("skyttelvektor"). I foretrukne utførelser av foreliggende oppfinnelse er kloningsvektoren i stand til å uttrykkes i en vertscelle, og "ekspresjonsvektoren" kan uttrykke NFIF i et nivå som er tilstrekkelig til at en NFκB-regulert reaksjonsvei i cellen påvirkes.

Et gen som koder for et NFIF-14b- og NFIF-7a, enten genomisk DNA eller cDNA, kan isoleres fra et humant genomisk bibliotek eller et cDNA-bibliotek. En "kodende DNA-sekvens" er en dobbelttrådet DNA-sekvens som transkriberes og translateres til et polypeptid i en celle *in vitro* eller *in vivo* når den plasseres under kontroll av egnede, regulatoriske sekvenser. De kodende DNA-sekvenser og de egnede regulatoriske sekvenser foreligger fortrinnsvis i en ekspresjonsvektor. Grensene til den kodende sekvens bestemmes av et startkodon i den 5' ende (aminoenden) og et translasjonsstoppkodon i den 3' ende (karboksylenden). En kodende sekvens kan omfatte, mener ikke begrenset til, prokaryote sekvenser, cDNA fra eukaryot mRNA, genomiske DNA-sekvenser fra eukaryot DNA (for eksempel pattedyrs-DNA), og til og med syntetiske DNA-sekvenser. Dersom den kodende sekvens er beregnet for ekspresjon i en eukaryot celle, vil et polyadenyleringssignal og en transskripsjonsterminatorsekvens vanligvis ligge 3' for den kodende sekvens. Fremgangsmåter for erholdelse av et gen ut fra DNA-sekvensinformasjonen som gis heri, er velkjent innen faget. DNA kan erholdes ved standard fremgangsmåter som er kjente innen faget fra klonet DNA (for eksempel et DNA-"bibliotek"). Det erholdes fortrinnsvis fra et cDNA-bibliotek fremstilt fra vev med høyt ekspresjonsnivå av proteinet. DNA kan også erholdes ved kloning av genomisk DNA eller fragmenter av dette, rensset fra den ønskede celle (se for eksempel Sambrook et al., 1989, *supra*; Glover, D. M. (red.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach. MRL Press, Ltd.,

Oxford, U.K. bind I, II) eller ved kjemisk syntese. Kloner avledet fra genomisk DNA kan inneholde regulatorisk DNA-områder og intron-områder i tillegg til kodende områder.

- 5 Fremgangsmåter for erholdelse av cDNA er velkjente innen faget. Kort beskrevet omfatter disse fremgangsmåtene isolering av en blanding av budbringer-RNA (mRNA) fra eukaryote celler og anvendelse av en serie av enzymatiske reaksjoner for syntese av dobbelttrådede DNA-kopier (cDNA) som er komplementære til de isolerte mRNA. "Polymerase-kjedereaksjon" (PCR) viser til *in vivo*-fremgangsmåter for amplifisering
10 av spesifikke DNA-sekvenser ved anvendelse av teknikker som er velkjente innen faget.

- Uavhengig av hvilken fremgangsmåte som anvendes for erholdelse av det ønskede cDNA, innsettes blandingen av dobbelttrådede cDNA i kloningsvektorer ved hvilken som helst av mange kjente teknikker, delvis avhengig av hvilken vektor som anvendes.
15 Forskjellige fremgangsmåter for innsetting diskuteres i Sambrook et al., 1989, *supra* og er velkjente innen faget. En "kassett" viser til et DNA-segment som kan innsettes i en vektor i ett eller flere spesifikke restriksjonssteder. DNA-segmentet koder for et polypeptid av interesse, og kassetten og restriksjonssettene er utformet slik at man sikrer innsetting av kassetten i korrekt leseramme for transkripsjon og translasjon.

- 20 Når først DNA-segmentene er innsatt i en kloningsvektor, anvendes kloningsvektoren for transformasjon av en egnet vert. En celle har blitt "transfektet" med eksogent eller heterologt DNA når slikt DNA har blitt innført i cellen. En celle har blitt "transformert" med eksogent eller heterologt DNA når det transfekteerte DNA gir en fenotypisk
25 endring. Det transformerende DNA kan integreres (kobles kovalent) inn i det kromosomale DNA som utgjør cellens genom. Disse kloningsvektorene innfører vanligvis et antibiotikaresistent trekk i verten. Slike verter er generelt prokaryote celler, og bare noen få av vertscellene inneholder det ønskede cDNA. De transfekteerte vertscellene utgjør et gen-"bibliotek" og tilveiebringer et representativt utvalg av de
30 mRNA som forelå i cellen som mRNA ble isolert ifra.

- Ut fra sekvensinformasjonen vedrørende NFIF-14b- og NFIF-7a som gis heri, kan et egnet oligonukleotid fremstilles, fortrinnsvis ved syntese, som diskutert ovenfor, og anvendes for å påvise kloner som inneholder NFIF-sekvenser. Oligonukleotidet
35 omfatter fortrinnsvis tilnærmet minst 18 nukleotider og kan hybridiseres til et genomisk DNA-molekyl, et cDNA-molekyl eller et mRNA-molekyl som koder for NFIF.

Oligonukleotidene kan merkes, for eksempel med ^{32}P -nukleotider eller nukleotider til hvilke en merkingsgruppe, for eksempel biotin, har blitt kovalent konjugert.

I en utførelse kan et merket oligonukleotid anvendes som probe for å påvise nærvær av en nukleinsyre som koder for NFIF. I en annen utførelse kan oligonukleotider (av hvilke
 5 ett eller begge kan være merket) anvendes som PCR-primere, enten for kloning av fullengde NFIF eller et NFIF-fragment eller for å påvise nærvær av nukleinsyrer som koder for NFIF. I ytterligere en utførelse kan et oligonukleotid danne en trippelheliks med et NFIF-DNA-molekyl.

10

Generelt fremstilles oligonukleotider syntetisk, fortrinnsvis i et nukleinsyresynteseinstrument. Følgelig kan oligonukleotider fremstilles med ikke naturlig forekommende fosfoesteranalogbindinger, for eksempel tioesterbindinger og så videre. For påvisning av kloner som inneholder NFIF-sekvensene, dyrkes de enkelte
 15 transformerte eller transfekterte cellene som kolonier på et nitrocellulosefilterpapir. Koloniene lyseres og DNA bindes kraftig til filterpapiret ved oppvarming. Filterpapiret inkuberes så med en merket oligonukleotidprobe som er komplementær til NFIF. DNA-fragmenter med vesentlig homologi med NFIF vil hybridisere til proben.

20 Som diskutert ovenfor, bestemmer betingelsene vedrørende temperatur og ionestyrke hybridiseringens "stringens". Hybridisering krever at de to nukleinsyrene inneholder komplementære sekvenser, selv om mistilpassede baser er mulig, avhengig av hybridiseringens stringens. Egnet stringens for hybridisering av nukleinsyrer avhenger av nukleinsyrenes lengde og graden av komplementaritet, variabler som er velkjente
 25 innen faget.

Proben hybridiserer med cDNA som den er komplementær med. Den kan påvises ved autoradiografi eller ved kjemiske reaksjoner som viser nærvær av proben. De tilsvarende kloner karakteriseres for påvisning av en klon eller en kombinasjon av
 30 kloner som inneholder hele den strukturelle informasjon for det ønskede protein. Nukleinsyresekvensen som koder for proteinet av interesse isoleres og innsettes i en ekspresjonsvektor. Ekspresjonsvektoren bringer det klonede gen under regulatorisk kontroll av spesifikke prokaryote eller eukaryote kontrollelementer som tillater effektiv ekspresjon (transkripsjon og translasjon) av det angjeldende ds-cDNA. Transkripsjons-
 35 og translasjonskontrollsekvenser er regulatoriske DNA-sekvenser, for eksempel promotere, enhancere og terminatorer, som sørger for ekspresjon av en kodende sekvens i en vertscelle. I eukaryote celler er polyadenyleringssignaler kontrollsekvenser. En

kodende sekvens er "under kontroll" av transkripsjons- og translasjonskontrollsekvenser i en celle dersom RNA-polymerase transkriberer den kodende sekvens til mRNA, som så spleises (dersom den kodende sekvens inneholder introner) og translateres til proteinet som kodes av den kodende sekvens.

5

Ytterligere seleksjon kan utføres basert på genets egenskaper. For eksempel kan nærvær av det ønskede gen i en klon påvises ved analyser basert på det uttrykte proteinprodukts fysiske, kjemiske eller immunologiske egenskaper. For eksempel kan cDNA-kloner eller DNA-kloner som danner et protein med egenskaper som likner eller er identiske med egenskapene til NFIF når det gjelder elektroforetisk migrering, isoelektrisk fokusering, ikke likevekts-pH-gelelektroforese, proteolytisk spalting eller antigenisitet utvelges.

10

Fremstilling av varianter av NFIF-polypeptider

15

Foreliggende oppfinnelse omfatter alleliske varianter, substitusjons-, addisjons- og delesjonsmutasjonsvarianter, analoger og derivater av NFIF og homologer fra andre arter med samme funksjonelle aktivitet som NFIF eller en homolog aktivitet. I foretrukne utførelser anvendes gener med delesjoner eller substitusjoner som øker evnen til å indusere NF κ B ved utførelse av oppfinnelsen. Fremstilling eller isolering av NFIF-varianter ligger innenfor foreliggende oppfinnelses område. Følgelig omfatter foreliggende oppfinnelse NFIF-varianter som er funksjonelt aktive, dvs. i stand til å fremvise en eller flere funksjonelle aktiviteter som er forbundet med NFIF.

20

NFIF-varianter kan fremstilles ved å endre kodende nukleinsyresekvenser ved substitusjoner, addisjoner eller delesjoner som tilveiebringer funksjonelt ekvivalente molekyler. Fortrinnsvis fremstilles NFIF-utførelser ved forsterket eller forhøyet funksjonell aktivitet sammenliknet med NFIF-14b- eller NFIF-7a.

25

Grunnet kodende nukleotidsekvensers degenerering, kan andre DNA-sekvenser som koder for i det vesentlige samme aminosyresekvens som NFIF, innbefattet en aminosyresekvens som inneholder en enkelt aminosyrevariant, anvendes ved utførelse av foreliggende oppfinnelse. Disse omfatter, men er ikke begrenset til alleliske gener, homologe gener fra andre arter, og nukleotidsekvenser som omfatter hele eller deler av NFIF, endret ved innføring av andre kodoner som koder for samme aminosyrerest i sekvensen, hvorved en taus endring fremstilles. Likeså omfatter NFIF-variantene ifølge oppfinnelsen, men er ikke begrenset til, varianter som inneholder som primær

30

35

aminosyresekvens hele eller en del av aminosyresekvensen til et NFIF-protein, innbefattet endrede sekvenser, hvori funksjonelt ekvivalente aminosyrer erstatter aminosyrerester i sekvensen, noe som fører til en konservativ aminosyresubstitusjon. For eksempel kan en eller flere aminosyrerester i sekvensen være substituert med en annen aminosyre med en liknende polaritet som fungerer som en funksjonell ekvivalent, noe som fører til en taus endring. Aminosyrer som skal erstatte en aminosyre i sekvensen kan utvelges fra andre medlemmer av den klasse som aminosyren tilhører. For eksempel omfatter de ikkepolare (hydrofobe) aminosyrer alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan og metionin. Aminosyrer som inneholder aromatiske ringstrukturer er fenylalanin, tryptofan og tyrosin. De polare, nøytrale aminosyrene omfatter glysin, serin, treonin, cystein, tyrosin, asparagin og glutamin. De positivt ladete (basiske) aminosyrene omfatter arginin, lysin og histidin. De negativt ladete (sure) aminosyrene omfatter asparaginsyre og glutaminsyre. Slike endringer vil ikke forventes å påvirke den tilsynelatende molekylvekt, bestemt ved polyacrylamidgelelektroforese, eller ved isoelektriske punkt.

Spesielt foretrukne substitusjoner er:

- Lys for Arg og omvendt, slik at en positiv ladning bibeholdes;
- Glu for Asp og omvendt, slik at en negativ ladning bibeholdes;
- Ser for Thr, slik at en fri -OH kan bibeholdes; og
- Gln for Asn, slik at en fri CONH₂ kan bibeholdes.

Aminosyresubstitusjoner kan også innføres for å innføre en aminosyre med en spesielt foretrukket egenskap. For eksempel kan en Cys innføres som et mulig sete for dannelsen av disulfidbroer med en annen Cys. En His kan innføres som et gitt "katalytisk" sete (dvs. at His kan virke som syre eller som base, og er den aminosyre som hyppigst deltar i biokjemisk katalyse). Pro kan innføres grunnet denne aminosyrens spesielle, flate struktur som innfører β -løkker i proteinets struktur.

Genene som koder for NFIF-variantene ifølge oppfinnelsen, kan fremstilles ved forskjellige fremgangsmåter som er kjente innen faget. De manipuleringer som fører til dannelsen av disse kan skje på gennivå eller proteinnivå. For eksempel kan den klonede NFIF-gensekvens modifiseres ved hvilken som helst av mange strategier som er kjente innen faget (Sambrook et al., 1989, *supra*). Sekvensen kan kuttes i egnede seter med en eller flere restriksjonsendonukleaser, om ønskelig fulgt av videre enzymatisk modifisering, isolering og ligering *in vitro*. Ved fremstilling av genet som koder for NFIF-utførelse bør forsiktighet utøves for å sikre at det modifiserte gen blir i den

samme translasjonelle leseramme som NFIF-genet, ikke avbrutt av translasjonsstoppsignalet, i genområdet hvor den ønskede aktivitet kodes.

I tillegg kan den NFIF-kodende nukleinsyresekvens muteres *in vitro* eller *in vivo* for
 5 innføring av eller ødeleggelse av translaterte sekvenser, initieringssekvenser og/eller
 termineringssekvenser, eller for å innføre variasjoner i kodende områder og/eller innføre
 nye restriksjonsendonukleaseseter eller ødelegge allerede foreliggende seter, for å
 forenkle videre modifisering *in vitro*. Slike mutasjoner fremmer fortrinnsvis den
 funksjonelle aktivitet av det muterte NFIF-genprodukt. Enhver mutageneseteknikk kjent
 10 innen faget kan anvendes, for eksempel setestyrte mutagenese *in vitro* (Hutchinson, C. et
 al., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253:6551; Zoller og Smith, 1984, *DNA*, 3:479-488; Oliphant et
 al., 1986, *Gene*, 44:177; Hutchinson et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:710),
 og anvendelse av "TAB" linkere (Pharmacia), og så videre. PCR-teknikker foretrekkes
 for setestyrte mutagenese (se Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", i PCR
 15 Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, red.,
 Stockton Press, kap. 6, s. 61-70).

Polypeptider basert på NFIF

20 En terapeutisk anvendbar variant av NFIF kan påvises ved en rekke fremgangsmåter,
 innbefattet *in vitro*-analyser, som kan anvendes for påvisning av ekspresjonsnivået for
 et NFκB-regulert gen eller et gen hvis ekspresjon reguleres av NFκB-regulerende
 elementer i nærvær av NFIF-varianten. En fremgangsmåte for påvisning av
 polynukleotider som kan forsterke (eller inhibere) NFκB-induksjon er å anvende et
 25 rapportørgensystem. Disse systemene benytter rapportørgenekspressjonsvektorer som
 omfatter et kloningssete, hvori en gitt promotor kan klones oppstrøms for et
 "rapportørgen" som lett kan påvises og kvantifiseres. En fagperson vil lett kunne påvise
 og subklone promoteren for NFκB, så vel som andre kontrollsekvenser, i en
 kommersielt tilgjengelig rapportørgenekspressjonsvektor. Ekspresjonsvektoren innføres i
 30 vertsceller, og vertscellene behandles med NFIF-variant (eller et mulig inhibitor- eller
 enhancermolekyl) for å bestemme virkningen på ekspresjonen av
 rapportørgenproduktet. Nærmere bestemt analyseres cellene for nærvær av
 rapportørgenproduktet direkte ved å måle mengden rapportør-mRNA,
 rapportørproteinet selv eller den enzymatiske aktivitet av rapportørproteinet. Ideelt
 35 uttrykkes rapportørgenet ikke endogent i celletypen av interesse og lar seg bestemme
 ved følsomme, kvantitative og hurtige analyser. En rekke
 rapportøranalysekonstruksjoner er kommersiell tilgjengelige, og flere rapportørgener og

rapportørgenanalyser har blitt utviklet og kan lett fremstilles av fagfolk. De mest populære systemene for måling av genetisk aktivitet i eukaryote celler omfatter kloramfenikol acetyltransferase (CAT), β -galaktosidase, ildflue-luciferase, veksthormon (GH), β -glukuronidase (GUS), alkalisk fosfatase (AP), grønt fluorescerende protein (GFP) og *Renilla*-luciferase. Rapportøranalysekonstruksjoner kan erholdes fra en rekke kilder, innbefattet Promega og Invitrogen.

Som nevnt ovenfor kan rapportørgenaktivitet påvises ved analyse av rapportør-mRNA eller rapportørprotein. Rapportør-mRNA kan påvises ved northern-blot analyse, ribonukleasebeskyttelsesanalyser eller RT-PCR. Selv om disse analysene er mer direkte enn måling av proteinekspresjonen, har det blitt utviklet mange analyser for å måle nærvær av rapportørprotein, snarere enn mRNA som foreligger i en celle. Rapportørproteiner kan analyseres ved spektrofotometri eller ved påvisning av enzymatisk aktivitet. Rapportørproteinnivået kan også måles med antistoffbaserte analyser. Generelt er de enzymatiske analysene svært følsomme og utgjør en foretrukket fremgangsmåte for måling av rapportørgenekspressjonen. En foretrukket, kommersielt tilgjengelig NF κ B-rapportørgenkonstruksjon er rapportørgenvektoren pNF κ B-Luc (luciferase), som er tilgjengelig fra Stratagene. Et eksempel på hvordan dette rapportørsystemet kan anvendes for kvantifisering av NFIF-proteinaktivitet gis i eksempel 4.

Eksperimenter av den type som diskuteres heri ovenfor kan anvendes for å fastslå i hvilken grad en gitt sykdomstilstand kan behandles ved anvendelse av preparatene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Diskusjonen som følger gjelder manipulering og ekspresjon av DNA som koder for polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Ekspresjonsvektorer som koder for NFIF-polypeptider

Den påviste og isolerte DNA-sekvens kan settes inn i en egnet klonings/ekspresjonsvektor (i det påfølgende betegnet "vektor") for å lette modifisering av sekvensen eller ekspresjon av proteinet. Disse vektorene omfatter typisk flere kloningsseter, promotere, sekvenser som letter replikasjonen i en vertscelle og seleksjonsmarkører.

Enhver egnet vektor kan anvendes. Mange slike vektorer er kjente innen faget. Eksempler på vektorer som kan anvendes, omfatter for eksempel plasmider og modifiserte virus. Vektoren er typisk kompatibel med en gitt vertscelle, i hvilken vektoren innføres for å lette replikasjon av vektoren og ekspresjon av de kodete proteiner. Innsetting av DNA-sekvensen i en gitt vektor, kan for eksempel oppnås ved å ligere DNA-fragmentet inn i en kloningsvektor med komplementære klebrige ender. Dersom de komplementære restriksjonssetene som anvendes for kutting av DNA ikke foreligger i kloningsvektoren, kan imidlertid DNA-molekylene ender modifiseres enzymatisk. Alternativt kan ethvert ønskelig sete dannes ved å ligere nukleotidsekvenser (linkere) til DNA-endene, de ligerte linkerene kan omfatte spesifikke, kjemisk syntetiserte oligonukleotider som koder for gjenkjenningssekvenser for restriksjonsendonukleaser. Egnede vektorer kan bestå av segmenter av kromosomale, ikke kromosomale og syntetiske DNA-sekvenser. Eksempler på spesifikke vektorer som er anvendbare ved utførelse av foreliggende oppfinnelse er *E. Coli*-bakteriofager, for eksempel lambdaderivater, eller plasmider, for eksempel pBR322-derivater eller pUC-plasmidderivater, for eksempel pmal-c, pFLAG, derivater av SV40 og kjente bakterieplasmider, for eksempel *E. Coli*-plasmidene col El, pCR1, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, *Gene* 67:31-40), pMB9 og derivater av disse, plasmider som RP4; bakteriofag-DNA, for eksempel det store antall derivater av bakteriofag 1, for eksempel NM989 og andre bakteriofag-DNA, for eksempel DNA fra M13 og filamentøse, enkelttrådede bakteriofager, gjærvektorer som 2 µm-plasmidet og derivater av dette, vektorer som kan anvendes i eukaryote celler, for eksempel vektorer som er anvendbare i insektceller, som baculovirusvektorer, vektorer som er anvendbare i pattedyrceller, vektorer avledet fra kombinasjoner av plasmider og bakteriofagDNA, plasmider som har blitt modifisert slik at de anvender ekspresjonskontrollsekvenser fra bakteriofag-DNA eller andre kilder, og liknende.

Eksempler på gjærvektorer som kan anvendes er ikke-fusjonsvektoren pYES2 (Invitrogen) eller fusjonsvektoren pYESHisA, B, C (Invitrogen).

Baculovirusvektorer som kan anvendes ved utførelse av oppfinnelsen, omfatter en rekke vektorer, innbefattet både ikke-fusjonsoverføringsvektorer som for eksempel pVL941 (Summers), pVL1393 (Invitrogen), pVL1392 (Summers og Invitrogen) og pBlueBacIII (Invitrogen), og fusjonsoverføringsvektorer, for eksempel pAc700 (Summers), pAc701 og pAc702, pAc360 (Invitrogen), og pBlueBacHisA, B, c (Invitrogen).

Pattedyrceller som omfattes for anvendelse i oppfinnelsen, omfatter for eksempel vektorer med induserbare promotere, for eksempel dihydrofolat reduktase (DHFR)-promoteren, for eksempel enhver ekspresjonsvektor med en DHFR-ekspresjonsvektor, eller en DHFR/methotrexat-koamplifiseringsvektor, for eksempel pED (se Kaufman, 5 *Current Protocols in Molecular Biology*, 16,12 (1991)). Alternativt kan en glutamin syntetase/metionin sulfoksimin-koamplifiseringsvektor, for eksempel pEE14 (Celltech) anvendes. I en annen utførelse kan en vektor som styrer episomal ekspresjon under kontroll av Epstein Barr-virus (EBV) anvendes, for eksempel pREP4 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMEP4 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen), og 10 pEBVHis (Invitrogen). Selekterbare pattedyrsvektorer for anvendelse i oppfinnelsen omfatter pRc/CMV (Invitrogen), pRc/RSV (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen) og andre. Kukoppevirusbaserte pattedyrsekspresjonsvektorer (se Kaufman, 1991, *supra*) for anvendelse ifølge oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til pSC11, pMJ601 og pTKgptF1S.

15

En rekke fremgangsmåter kan anvendes for å bekrefte at den ønskede DNA-sekvens som koder for NFIF-14b-, NFIF-7a eller en annen NFIF-variant, har blitt klonet i en vektor. Generelt anvendes en eller flere av følgende tilnærminger: (a) PCR-amplifisering av det ønskede plasmid-DNA eller det spesifikke RNA, (b) nukleinsyre 20 hybridisering, (c) nærvær eller fravær av seleksjonsmarkørgenfunksjoner, (d) analyser med egnede restriksjonsendonukleaser, og (e) ekspresjon av innsatte sekvenser. I den første tilnærming kan nukleinsyrene amplifiseres ved PCR for påvisning av det amplifiserte produkt. I den andre tilnærmingen kan nærvær av et fremmed gen innsatt i en ekspresjonsvektor, påvises ved nukleinsyrehybridisering ved anvendelse av prober 25 som omfatter sekvenser som er homologe med et innsatt markørgen. I den tredje tilnærmingen kan det rekombinante vektor/vertssystem påvises og selekteres, basert på nærvær eller fravær av visse "seleksjonsmarkør"-genfunksjoner (for eksempel β -galaktosidaseaktivitet, tymidin kinaseaktivitet, antibiotika resistens, transformasjonsfenotype, dannelse av okklusjonslegemer i bakulovirus og så videre) 30 som skyldes innsetting av fremmede gener i vektoren. I et annet eksempel kan rekombinanter som inneholder NFIF-innskuddet, påvises ved fravær av seleksjonsmarkørgenfunksjonen, dersom nukleinsyren som koder for NFIF er innsatt i vektorens "seleksjonsmarkør"-gensekvens. I den fjerde tilnærmingen påvises rekombinante ekspresjonsvektorer ved kutting med egnede restriksjonsenzymer. I den 35 femte tilnærmingen kan rekombinante ekspresjonsvektorer påvises ved å analysere for aktiviteten eller biokjemiske eller immunologiske egenskaper til genproduktet som

uttrykkes av rekombinanten, forutsatt at det uttrykte protein inntar en funksjonelt aktiv konformasjon.

Promotere

5

Nukleotidsekvensen som koder for NFIF-14b-, NFIF-7a eller en NFIF-variant av disse, kan innsettes i en ekspresjonsvektor som inneholder de nødvendige elementer for transkripsjon og translasjon av den innsatte proteinkodende sekvens. Slike elementer betegnes heri en "promoter".

10

En promoter er et regulatorisk DNA-område som kan binde RNA-polymerase i en celle og innlede transkripsjon av en nedstrøms (plassert i den 3' retning) kodende sekvens. For det formål å definere foreliggende oppfinnelse, er promotersekvensen avgrenset i sin 3' ende av transkripsjonsinitieringssetet, og den strekker seg oppstrøms (i 5' retning) slik at den omfatter det minimale antall baser eller elementer som er nødvendige for å initiere transkripsjonen på et nivå som kan påvises over bakgrunnsnivået. I promotersekvensen vil det foreligge et transkripsjonsinitieringssete (som for eksempel kan defineres ved kartlegging med nuklease S1), så vel som proteinbindende domener (konsensus sekvenser) som er ansvarlige for binding av RNA-polymerase.

20

Nukleinsyren som koder for polypeptidene ifølge oppfinnelse, er operativt koblet til en promoter i en ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen. Både cDNA-sekvenser og genomiske sekvenser kan kloneres og uttrykkes under kontroll av slike regulatoriske sekvenser. En ekspresjonsvektor omfatter også fortrinnsvis et replikasjonsorigo. De nødvendige transkripsjonssignaler og translasjonssignaler kan foreligge i en rekombinant ekspresjonsvektor, eller de kan tilføres av det native gen som koder for NFIF og/eller dets flankerende områder. Enhver av fremgangsmåtene som tidligere er beskrevet for innsetting av DNA-fragmenter i en kloningsvektor, anvendes for konstruksjon av ekspresjonsvektorer som inneholder et gen bestående av egnede transkripsjons/translasjonskontrollsignaler og de proteinkodende sekvenser. Disse fremgangsmåtene kan omfatte rekombinant DNA-teknikker og synteseteknikker *in vitro* og *in vivo*-rekombinasjon (genetisk rekombinasjon).

35

Ekspresjonen kan kontrolleres ved ethvert promoter/enhancerelement som er kjent innen faget, men disse regulatoriske elementene må være funksjonelle i verten som er utvalgt for ekspresjon. Eksempler på promotere som kan anvendes for kontroll av NFIF-genekspresjonen, omfatter det tidlige promoterområdet fra SV40 (Benoist og Chambon,

1982 *Nature*, 290:304-310), promoteren som inngår i den lange 3'-terminale repetisjon i Rous sarkomvirus (Yamamoto et al., 1980, *Cell*, 22:787-797), tymidinkinasepromoteren fra herpesvirus (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441-1445), de regulatoriske sekvenser fra metallotioneingenet (Brinster et al., 1982, *Nature*, 296:39-42); prokaryote ekspresjonsvektorer, for eksempel β -laktamasepromoterer (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731), eller *tac*-promoteren (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25); promoterelementer fra gjær eller annen sopp, for eksempel Gal 4-promoteren, ADC (alkoholdehydrogenase)-promoteren, PGK (fosfoglykol kinase)-promoteren, promoteren fra alkalisk fosfatase og transkripsjonskontrollområder fra dyr, som viser vevsspesifisitet og har blitt utnyttet i transgene dyr: kontrollområdet fra elastase I-genet som er aktivt i acinarceller i bukspyttkjertelen (Swift et al., 1984, *Cell*, 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor, *Symp. Quant. Biol.*, 50:399-409, MacDonald, 1987, *Hepatology*, 7:425-515); kontrollområdet fra insulingenet som er aktivt i betaceller i bukspyttkjertelen (Hanahan, 1985, *Nature*, 315:115-122), kontrollområdet fra immunglobulingenet som er aktivt i lymfoide celler (Grosschedl et al., 1984, *Cell*, 38:647-658; Adams et al., 1985, *Nature*, 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444), kontrollområdet fra musebrysttumovirus som er aktivt i testikkelceller, brystceller, lymfoide celler og mastceller (Leder et al., 1986, *Cell*, 45:485-495), kontrollområdet fra albumingenet som er aktivt i lever (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.*, 1:268-276), kontrollområdet fra alfa-fetoproteingenet som er aktivt i lever (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science*, 235:53-58), kontrollområdet fra alfa 1-antitrypsingenet som er aktivt i lever (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.*, 1:161-171), kontrollområdet fra beta-globingenet som er aktivt i myelolide celler (Mogam et al., 1985, *Nature*, 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell*, 46:89-94), kontrollområdet fra myelinbasisk protein-genet som er aktivt i oligodendrocyttceller i hjernen (Readhead et al., 1987, *Cell*, 48:703-712), kontrollområdet fra myocinlettkjede-2-genet som er aktivt i skjelettmuskel (Sani, 1985, *Nature*, 314:283-286), og kontrollområdet fra genet for gonadotropinfrigivende hormon som er aktivt i hypothalamus (Mason et al., *Science*, 234:1372-1378).

En foretrukket promoter for anvendelse i ekspresjonsvektorkonstruksjonene som diskuteres heri nedenfor, er cytomegalovirus (CMV)-promoteren, som kan gi høyt ekspresjonsnivå i en rekke pattedyrcellelinjer.

Innføring av vektorer i vertsceller

Vektorer kan innføres i vertsceller ved enhver egnet fremgangsmåte, innbefattet for eksempel transfeksjon, elektroporering, mikroinjeksjon, transduksjon, cellefusjon, DEAE-dekstran, kalsiumfosfatutfelling, lipofeksjon (lysosom fusjon), anvendelse av en genkanon eller en DNA-vektortransportør (se for eksempel Wu et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:963-967; Wu og Wu, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624; Hartmut et al., kanadisk patentsøknad nr. 2 012 311, innlevert 15. mars 1990), slik at mange kopier av gensekvensen dannes. I en foretrukket fremgangsmåte, transfekteres celler *in vitro* ved anvendelse av "Lipfectamine", tilgjengelig fra Gibco-BRL. Det klonede gen foreligger fortrinnsvis i et skyttelvektorplasmid som muliggjør ekspansjon i en kloningscelle, for eksempel *E. Coli*, og letter rensing for påfølgende innføring i en egnet ekspresjonscellelinje. For eksempel kan en skyttelvektor, som er en vektor som kan replikeres i mer enn en type organisme, fremstilles for replikasjon i både *E. Coli* og *Saccharomyces cerevisiae* ved å sammenkoble sekvenser fra et *E. Coli*-plasmid og sekvenser fra 2 µm-plasmidet fra gjær.

15

Vertscellesystemer

Vertscellesystemer omfatter pattedyrvertscellesystemer, insektvertscellesystemer og mikroorganismer som gjær eller bakterier. Avhengig av det benyttede vertscellesystem, kan hvilke som helst av et stort antall egnede transkripsjons- og translasjonselementer anvendes.

I tillegg kan det utvelges en vertscellestamme som modulerer ekspresjonen av de innsatte sekvenser eller modifiserer og prosesserer genproduktet på den spesifikke måte som ønskes. Forskjellige vertsceller har karakteristiske og spesifikke mekanismer for translasjonell og posttranslasjonell prosessering og modifisering av proteiner. Egnede cellelinjer eller vertsceller kan utvelges for å sikre den ønskede modifisering og prosessering av det fremmede protein som uttrykkes. Ekspresjon i gjær kan gi et biologisk aktivt produkt. Ekspresjon i eukaryote celler kan øke sannsynligheten for "nativ" folding. Videre kan ekspresjon i pattedyrceller være nyttig for rekonstitusjon eller konstitusjon av NFIF-inhiberende aktivitet. Videre kan forskjellige vektor/vertsekspresjonssystemer påvirke prosesseringsreaksjoner, for eksempel proteolytisk kløyving, i varierende grad. Ekspresjonsvektorer ifølge oppfinnelsen kan som pekt på ovenfor, anvendes for transfeksjon av celler både for søk etter og for biologisk analyse av modulatorer av NFIF-aktivitet.

35

Eksempler på aksepterbare pattedyrvertsceller er HEK 293-celler og COS7-celler.

Rekombinant NFIF-14b-, NFIF-7a eller en NFIF-variant ifølge oppfinnelsen kan uttrykkes kromosomalt etter integrering av den kodende sekvens ved rekombinasjon. I denne sammenheng kan ethvert av et stort antall amplifiseringssystemer anvendes for å
 5 oppnå høyt nivå av stabil genekspresjon (Se Sambrook et al., 1989, *supra*).

Cellen som den rekombinante vektor som omfatter nukleinsyren som koder for NFIF er innført dyrkes i et egnet celledyrkingsmedium under betingelser som gir ekspresjon av et NFIF-polypeptid ved cellen.

10

Når først et egnet vertssystem og egnede dyrkingsbetingelser er etablert, kan rekombinante ekspresjonsvektorer omformes og fremstilles i større mengder. Løselige former av proteinet kan erholdes ved å oppsamle dyrkningsvæske eller ved solubilisering av inklusjonslegemer, for eksempel ved detergent behandling og om
 15 ønskelig, ultralydbehandling eller andre mekaniske prosesser, som beskrevet ovenfor. Det solubiliserte eller løselige protein kan isoleres ved anvendelse av forskjellige teknikker, innbefattet polyacrylamidgelelektroforese (PAGE), isoelektrisk fokusering, todimensjonal gelelektroforese, kromatografi (for eksempel ionebytterkromatografi, affinitetskromatografi, immunaaffinitetskromatografi og
 20 størrelsesseleksjonskromatografi), sentrifugering, differensiell løselighet, immunutfelling eller ved enhver annen standard teknikk for rensing av proteiner.

Som diskutert ovenfor er en "vektor" ethvert middel for overføring av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen til en vertscelle. Foretrukne vektorer er virusvektorer, for eksempel
 25 retrovirus, herpesvirus, adenovirus og adenoassosierte virus. Et gen som koder for et protein eller polypeptiddoménefragment ifølge foreliggende oppfinnelse innføres således *in vivo*, *ex vivo* eller *in vitro* ved anvendelse av en virusvektor eller ved direkte innføring av DNA. Ekspresjon i ønskede vev kan oppnås ved å styre den transgene vektor til spesifikke celler, for eksempel med en virusvektor eller en reseptorligand, ved
 30 anvendelse av vevsspesifikk promoter eller på begge disse måter.

Diskusjonen som følger skisserer forskjellige virale og ikke-virale systemer som kan anvendes for innføring av DNA i en vertscelle *in vivo* eller *in vitro*.

35 Virale vektorsystemer

NFIF-polypeptidene, så vel som "antisens"-nukleinsyrene, ribozymene og antistoffene som diskuteres heri nedenfor, kan fremstilles *in vitro* eller *ex vivo* eller være utformet for ekspresjon *in vivo* i en pasient ved anvendelse av et egnet ekspresjonssystem innført via et viralt vektorsystem.

5

Virusvektorer som hyppig anvendes for *in vivo*- eller *ex vivo*-målstyring og behandlingsfremgangsmåter er DNA-baserte vektorer og retrovirale vektorer.

Fremgangsmåter for konstruksjon og anvendelse av virusvektorer er kjente innen faget (se for eksempel Miller og Rosman, *BioTechniques*, 7:980-990 (1992)). Virusvektorene
 10 er fortrinnsvis replikasjonsdefisiente, dvs. at de ikke kan replikeres autonomt i målcellen. Generelt mangler genomet til de replikasjonsdefisiente virusvektorene som anvendes innenfor foreliggende oppfinnelses formål minst ett område som er nødvendig for replikasjon av viruset i den infiserte celle. Disse områdene kan enten være fjernet (fullstendig eller delvis) eller gjort ikke-funksjonelle ved enhver teknikk som er kjent
 15 blant fagfolk. Disse teknikkene omfatter fullstendig fjerning, substitusjon (med andre sekvenser, fortrinnsvis med den innsatte nukleinsyren), delvis delesjon eller addisjon av en flere baser til et essensielt (for replikasjonen) område. Slike teknikker kan utføres *in vivo* (på det isolerte DNA) eller *in situ* ved anvendelse av teknikker for genetisk manipulering eller ved behandling av mutagene midler. Ved replikasjonsdefisiente virus
 20 bibeholder fortrinnsvis de sekvenser i genomet som er nødvendige for innkapsling av viruspartiklene.

DNA-virusvektorer omfatter et svekket eller defekt DNA-virus, for eksempel, men ikke begrenset til, herpes simplex-virus (HSV), papillomavirus, Epstein Barr-virus (EBV),
 25 adenovirus, adenoassosiert virus (AAV), kukoppevirus og liknende. Defekte virus som fullstendig eller nesten fullstendig mangler virusgener foretrekkes. Defekte virus er ikke replikasjonskompetente etter innføring i en celle og gir således ingen produktiv virusinfeksjon. Anvendelse av defekte virusvektorer tillater tilførsel til celler i et spesifikt, lokalisert område uten bekymring for at vektoren kan infisere andre celler.
 30 Behandlingen kan således omfatte et spesifikt vev. Eksempler på spesielle vektorer omfatter, men er ikke begrenset til, en defekt herpesvirus 1 (HSV1)-vektor (Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.*, 2:320-330 (1991)), en defekt herpesvirusvektor som mangler et glykoprotein L-gen (Patent skrift RD 371005 A), eller andre defekte herpesvirusvektorer (Internasjonalt patentskrift nr. WO 94/21807, publisert 29.
 35 september 1994; Internasjonalt patentskrift nr. WO 92/05263, publisert 2. april 1994); en svekket adenovirusvektor, for eksempel vektoren som beskrives av Stratford-Perricaudet et al., (*J. Clin. Invest.*, 90:626-630 (1992); se også La Salle et al., *Science*,

259:988-990, (1993)); og en defekt adenoassosiert virusvektor (Samulski et al., *J. Virol.*, 61:3096-3101 (1987); Samulski et al., *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989); Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996 (1988)).

- 5 For tilførsel *in vivo* benyttes fortrinnsvis en egnet immunsuppressiv behandling i forbindelse med virusvektoren, for eksempel adenovirusvektoren, for å unngå immundeaktivering av virusvektoren og transfekterte celler. For eksempel kan immunsuppressive cytokiner, slik som interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ), eller anti-CD4-antistoff tilføres for å blokkere humorale eller cellulære immunresponser mot
- 10 virusvektorene. I tillegg er det fordelaktig å benytte en virusvektor som er modifisert slik at den uttrykker et minimalt antall antigener.

Det er mulig å tilføre en vektor som vil uttrykke en terapeutisk effektiv mengde av NFIF for genterapiformål. Begrepet "terapeutisk effektiv mengde" anvendes heri for å

15 angi en mengde som er tilstrekkelig til å gi en forbedring av en klinisk signifikant tilstand i verten.

Visse virusvektorsystemer er godt utviklet innen teknikkens stand og egnet for behandling.

20

Adenovirusvektorsystemer

I en foretrukket utførelse er vektoren en adenovirusvektor. Adenovirus er eukaryote DNA-virus som kan modifiseres slik at de effektivt tilfører en nukleinsyre ifølge

25 oppfinnelsen til en rekke celletyper. Det finnes serotyper av adenovirus. Av disse serotypene foretrekkes innenfor foreliggende oppfinnelses omfang anvendelse av humane adenovirus type 2 eller type 5 (Ad 2 eller Ad 5), eller adenovirus med opphav i dyr (se WO 94/26914). De adenovirus av dyreopphav som kan anvendes innenfor foreliggende oppfinnelses omfang omfatter adenovirus med opphav i hund, storfe, mus

30 (for eksempel Mav1, Beard et al., *Virology*, 75 (1990) 81), storfe, gris, fjærkre og ape (for eksempel: SAV).

De replikasjonsdefekte adenovirusvektorene ifølge oppfinnelsen omfatter fortrinnsvis ITR, en innkapslingssekvens og nukleinsyren av interesse. Ytterligere mer foretrukket

35 er i det minste E1-området i adenovirusvektoren ikke-funksjonelt. Delesjonen i E1-området strekker seg fortrinnsvis fra nukleotid 455 til nukleotid 3329 i sekvensen til Ad5 adenovirus (PvuII-BgIII fragment) eller 382 til 3446 (HinfII-Sau3A fragment).

Andre områder kan også være modifiserte, særlig E3-området (WO 95/02697), E2-området (WO 94/28938), E4-området (WO 94/28152, WO 94/12649 og WO 95/02697), eller i ethvert av de sene genene L1-L5.

- 5 Adenovirusvektoren kan ha en delesjon i E1-området (Ad 1.0). Eksempler på adenovirus med delesjoner i E1 beskrives i EP 185 573. Videre kan adenovirusvektoren ha en delesjon i E1-området og i E4-området (Ad 3.0). Eksempler på adenovirus med delesjon i E1/E4 beskrives i WO 95/02697 og WO 96/22378, det er også mulig at adenovirusvektoren har en delesjon i E1-området i hvilken E4-området og
10 nukleinsyresekvensen er innsatt (se FR94 13355).

- De replikasjonsdefisiente rekombinante adenovirusene ifølge oppfinnelse kan fremstilles ved enhver teknikk som er kjent blant fagfolk (Levrero et al., *Gene*, 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, *EMBO J.*, 3 (1984) 2917). Nærmere bestemt kan de
15 fremstilles ved homolog rekombinasjon mellom et adenovirus og et plasmid som blant annet bærer DNA-sekvensen av interesse. Den homologe rekombinasjon oppnås etter kotransfeksjon av adenoviruset og plasmidet inn i en egnet cellelinje. Cellelinjen som benyttes bør fortrinnsvis (i) være transformerbar med de nevnte elementer, og (ii) inneholde sekvenser som kan komplementere den manglende del av genomet til det
20 replikasjonsdefisiente adenovirus, fortrinnsvis i integrert form for å unngå faren for rekombinasjon. Eksempler på cellelinjer som kan anvendes er den humane, embryonale nyrecellelinje 293 (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36 (1977) 59) som inneholder den venstre del av genomet til et Ad5-adenovirus (12%) integrert i sitt genom, og cellelinjer som kan komplementere E1- og E4-funksjonen, som beskrevet i patentsøknadene WO
25 94/26914 og WO 95/02697. Rekombinante adenovirus gjenvinnes og renses ved anvendelse av standard molekylærbiologiske teknikker som er velkjente blant gjennomsnittsfagfolk.

Adenoassosiert virusvektorsystemer

- 30 Adenoassosierte virus (AAV) er DNA-virus med relativt liten størrelse som kan integreres på en stabil og setespesifikk måte i genomet til cellene som de infiserer. De kan infisere et bredt utvalg av celler uten å indusere noen virkninger på cellevekst, morfologi eller differensiering, og de ser ikke ut til å inngå i humane sykdomstilstander.
35 AAV-genomet har blitt konet, sekvensert og karakterisert. Det omfatter tilnærmet 4700 baser, og inneholder et invertert enderepetisjons (ITR)-område på tilnærmet 145 baser i hver ende, som fungerer som replikasjonsorigo for viruset. Resten av genomet er delt i

to essensielle områder som omfatter innkapslingsfunksjonene: Den venstre del av genomet, som inneholder rep-genet som deltar i virusreplikasjon og ekspresjon av virusgenene, og den høyre del av genomet, som inneholder cap-genet som koder for virusets capsidproteiner.

5

Anvendelse av vektorer avledet fra AAV for overføring av gener *in vitro* og *in vivo* er beskrevet (se WO 91/18088; WO 93/09239; US 4 797 368, US 5 139 941, EP 488 528). Disse publikasjoner beskriver forskjellige AAV-avledete konstruksjoner i hvilke rep- og/eller cap-genet er delert og erstattet med et gen av interesse, og anvendelse av disse konstruksjoner for overføring av genet av interesse *in vitro* (i dyrkede celler) eller *in vivo* (direkte inn i en organisme). De replikasjonsdefisiente rekombinante AAV ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved kotransfeksjon av et plasmid som inneholder nukleinsyresekvensen av interesse, flankert av to inverterte enderepetisjons (ITR)-områder fra AAV, og et plasmid som bærer AAV-innkapslingsgenene (rep- og cap-genet) i en cellelinje som er infisert med et humant hjelpevirus (for eksempel et adenovirus). AAV-rekombinantene som dannes, renses så ved standard teknikker.

Oppfinnelsen gjelder derfor også et AAV-avledet rekombinant virus hvis genom omfatter en sekvens som koder for en nukleinsyre som koder for NFIF eller NFIF-varianter, flankert av ITR fra AAV. Oppfinnelsen gjelder også et plasmid som omfatter en sekvens som koder for en nukleinsyre som koder for NFIF eller NFIF-varianter, flankert av to ITR fra et AAV. Et slikt plasmid kan anvendes uendret for overføring av nukleinsyresekvensen, hvor plasmidet om ønskelig ert inkorporert i en liposomal vektor (pseudovirus).

25

Retrovirusvektorsystemer

I en annen utførelse kan genet innføres i en retrovirusvektor, for eksempel som beskrevet i Anderson et al., U.S. patentskrift nr. 5 399 346; Mann et al., 1983, *Cell*, 33:153; Temin et al., U.S. patentskrift nr. 4 650 764; Temin et al., U.S. patentskrift nr. 4 980 289; Markowitz et al., 1988, *J. Virol.*, 62:1120; Temin et al., U.S. patentskrift nr. 5 124 263; EP 453242, EP 178220; Bernstein et al., *Genet. Eng.*, 7 (1985) 235; McCormick, *BioTechnology*, 3 (1985) 689; Internasjonalt patentskrift nr. WO 95/07358, publisert 16. mars 1995, tilhørende Dougherty et al.; og Kuo et al., 1993, *Blood* 82:845. Retrovirus er integrerende virus som infiserer celler som deler seg. Retrovirusgenomet omfatter to LTR, en innkapslingssekvens og tre kodende områder (*gag*, *pol* og *env*). I rekombinante retrovirusvektorer er *gag*-, *pol*- og *env*-genet generelt delert, helt eller

35

delvis, og erstattet med en heterolog nukleinsyresekvens av interesse. Disse vektorene kan konstrueres fra forskjellige typer retrovirus, for eksempel HIV, MoMuLV ("muse-Moloney-leukemivirus"), MSV ("muse-Moloney-sarkomvirus"), HaSV ("Harvey sarkomvirus"), "SNV ("miltnekrosevirus"), RSV ("Rous sarkomvirus") og Friend-virus.

5 Defekte retrovirusvektorer beskrives i WO 95/02697.

For konstruksjon av rekombinante retrovirus som inneholder en nukleinsyresekvens, konstrueres generelt et plasmid som inneholder LTR, innkapslingssekvensen og den kodende sekvens. Denne konstruksjon anvendes for transfeksjon av en pakkecellelinje, som i trans leverer retrovirusfunksjonene som mangler i plasmidet. Generelt kan pakkecellelinjene således uttrykke genene gag, pol og env. Slike pakkecellelinjer er beskrevet innen teknikkens stand, nærmere bestemt cellelinjen PA317 (U.S. patentskrift nr. 4 861 719), cellelinjen PsiCRIP (WO 90/02806) og cellelinjen GP+envAm-12 (WO 89/07150). I tillegg kan de rekombinante retrovirusvektorene inneholde modifikasjoner i LTR for å undertrykke transkripsjonsaktiviteten, så vel som omfattende innkapslingssekvenser som kan omfatte en del av gag-genet (Bender et al., *J. Virol.*, 61 (1987) 1639). Rekombinante retrovirusvektorer renses ved standard teknikker som er kjente blant gjennomsnittsfagfolk.

20 Retrovirusvektorer kan konstrueres slik at de fungerer som infeksjose partikler eller slik at de gjennomgår en enkelt transfeksjonsrunde. I det første tilfellet er viruset modifisert slik at det bibeholder alle sine gener bortsett fra de som er ansvarlige for egenskapene forbundet med onkogen transformasjon, og slik at det uttrykker det heterologe gen. Ikke infeksjose virusvektorer er fremstilt slik at det virale pakkesignal er ødelagt, men slik at de bibeholder de strukturelle genene som er nødvendige for pakking av det samtidig innførte virus som er modifisert slik at det inneholder det heterologe gen og pakkesignalene. Viruspartiklene som dannes er således ikke i stand til å produsere ytterligere virus.

30 **Ikkevirale systemer**

Visse ikke virale systemer har blitt anvendt innen faget og kan lette innføring av DNA som koder for NFIF-polypeptidene, "antisens"-nukleinsyrer, ribozymmer og antistoffer.

35 **Lipofeksjostilførselssystemer**

En vektor kan innføres *in vivo* ved lipofeksjon. I løpet av det siste tiår har liposomer fått økende anvendelse for innkapsling og transfeksjon av nukleinsyrer *in vitro*. Syntetiske, kationiske lipider utformet slik at problemene og farene forbundet med liposomformidlet transfeksjon minimaliseres, kan anvendes for fremstilling av liposomer for *in vivo*-transfeksjon av et gen som koder for en markør (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:7413-7417 (1987); se Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8027-8031 (1988); Ulmer et al., *Science*, 259:1745-1748 (1993)). Anvendelse av kationiske lipider kan fremme innkapsling av negativt ladete nukleinsyrer og også fremme fusjon med negativt ladete cellemembraner (Felgner og Ringold, *Science*, 337:387-388 (1989)). Spesielt anvendbare lipidforbindelser og preparater for overføring av nukleinsyrer beskrives i de internasjonale patentskriftene WO 95/18863 og WO96/17823, og i U.S. patentskrift nr. 5 459 127. Anvendelse av lipofeksjon for innføring av eksogene gener i spesifikke organer *in vivo* har visse praktiske fordeler. Molekylær styring av liposomer til spesifikke celler representerer et fordelaktig område. Det er klart at det å styre transfeksjonen til gitte celletyper vil være spesielt fordelaktig i et vev med cellulær heterogenitet, for eksempel bukspyttkjertel, lever, nyre og hjerne. Lipider kan kobles kjemisk til andre molekyler for målstyring (se Mackey et al., *supra*). Målstyrende peptider, for eksempel hormoner eller neurotransmittere, og proteiner, for eksempel antistoffer, eller ikkepeptidmolekyler kan kobles kjemisk til liposomer.

Andre molekyler er også anvendbare for å lette transfeksjonen av en nukleinsyre *in vivo*, for eksempel et kationisk oligopeptid (se for eksempel internasjonalt patentskrift WO 95/21931, peptider avledet fra DNA-bindende proteiner (se for eksempel internasjonalt patentskrift WO 96/25508) eller en kationisk polymer (se for eksempel internasjonalt patentskrift WO 95/21931).

Tilførselssystemer for nakent DNA

Det er også mulig å innføre vektoren *in vivo* som et nakent DNA-plasmid (se U.S. patentskrifter nr. 5 693 622, 5 589 466, 5 580 859). Nakne DNA-vektorer for genterapi kan innføres i de ønskede vertsceller ved fremgangsmåter som er kjente innen faget, for eksempel transfeksjon, elektroporering, mikroinjeksjon, transduksjon, cellefusjon, DEAE-dekstran, kalsiumfosfatutfelling, anvendelse av en genkanon eller anvendelse av en DNA-vektortransportør (se for eksempel Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 267:963-967 (1992); Wu og Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624 (1988); Hartmut et al., kanadisk patentsøknad nr. 2 012 311, innlevert 15. mars 1990; Williams et al., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A., 88:2726-2730 (1991)). Tilnærminger med reseptorformidlet DNA-tilførsel kan også anvendes (Curiel et al., *Hum. Gene Ther.*, 3:147-154 (1992); Wu og Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432 (1987)).

5 **Anvendelse for NFIF-polypeptider**

Som nevnt ovenfor er det i visse situasjoner ønskelig å inducere NFκB for å initiere eller øke omfanget av en immunrespons. For induksjon av NFκB kan NFIF-polypeptidene innføres i en pasients kropp ved en rekke fremgangsmåter.

10

Fremgangsmåtene som anvendes for innføring av NFIF i en pasients kropp omfatter direkte tilførsel av rensede NFIF-polypeptider eller innføring av nukleinsyre som koder for NFIF-polypeptider i ekspresjonsvektorer som uttrykker polypeptidene i pasientens kropp.

15

I utførelser som omfatter direkte tilførsel av NFIF-polypeptider fremstilles NFIF-polypeptidene ved anvendelse av vertscelleekspresjonssystemer som dem beskrevet ovenfor. Polypeptidene renses ved anvendelse av konvensjonelle rensefremgangsmåter og blandes så med en egnet, biologisk kompatibel løsning som beskrevet i detalj
20 nedenfor. Løsningen som inneholder polypeptidet innføres i pasienten ved topisk, oral, parenteral, intranasal, subkutan eller intraokkular tilførsel. Når polypeptidet først er i kroppen kan det utøve sin virkning, inducere NFκB og derved gi en forhøyet aktivitet av NFκB-regulerte reaksjonsveier, innbefattet immunresponser.

25

I utførelser som omfatter tilførsel av nukleinsyrer som koder for NFIF-polypeptider, kan virale eller ikkevirale systemer som benytter ekspresjonsvektorer som kan uttrykke NFIF-polypeptider, innføres i pasientens kropp. Hvilke som helst av de virale eller ikkevirale transfeksjonssystemene som beskrives ovenfor, kan anvendes. De virale og ikke virale vektorsystemene kombineres også med en egnet, biologisk kompatibel
30 løsning for å lette innførsel av dem i kroppen. Når først en viral eller ikkeviral vektor er innført i kroppen, kan nukleinsyren som koder for NFIF-polypeptidet integreres i vertsgenomet, noe som gir stabil ekspresjon av NFIF-polypeptider, som utøver sin virkning som beskrevet ovenfor, over lang tid. Forbigående ekspresjon kan oppnås med systemer som innfører nukleinsyren i celler, men som ikke integreres i genomet.

35

NFIF-14b- og NFIF-7a-polypeptidet inneholder signalsekvenser, noe som tyder på at disse polypeptidene kan uttrykkes i en celle, mens deres virkning utøves i en annen

celle. Følgelig kan NFIF-polypeptidene uttrykkes i celler som så frigir NFIF-polypeptid i blodstrømmen eller et annet transportsystem (lymfe og så videre), hvor de transporteres til vev hvor de utøver sin virkning på NFκB-induksjonen.

- 5 Diskusjonen som følger, beskriver hvordan man kan påvise preparater og fremgangsmåter for regulering av NFκB-induksjonen basert på den foreliggende oppdagelsen av NFIF-polypeptidene.

Preparater

10

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer preparater i en biologisk, kompatibel (biokompatibel) løsning som omfatter polypeptidene, nukleinsyrene og vektorene ifølge oppfinnelsen. En biologisk kompatibel løsning er en løsning hvori polypeptidet, nukleinsyren eller vektoren ifølge oppfinnelsen bibeholdes i aktiv form, for eksempel i
 15 en form som kan utøve en biologisk aktivitet. For eksempel kan et polypeptid ifølge oppfinnelsen ha NFκB-aktiverende eller -deaktiverende aktivitet, et antistoff (som selv er et polypeptid) kan binde et polypeptid ifølge oppfinnelsen, en nukleinsyre kan være i stand til å replikeres, translatere et budskap eller hybridisere til en komplementær nukleinsyre, og en vektor vil være i stand til å transfektere en målcelle. Generelt vil en
 20 slik biologisk kompatibel løsning være en vandig buffer, for eksempel Tris-buffer, fosfatbuffer eller hepes-buffer som inneholder saltioner. Konsentrasjonen av saltionene vil vanligvis tilsvare et fysiologisk nivå. I en spesifikk utførelse er den biokompatible løsning et farmasøytisk aksepterbart preparat. Biologisk kompatible løsninger kan omfatte stabiliseringsmidler og konserveringsmidler.

25

Slike preparater kan utformes for topisk, oral, parenteral, intranasal, subkutan og intraokkular tilførsel. Parenteral tilførsel er ment å omfatte intravenøs injeksjon, intramuskulær injeksjon, intraarteriell injeksjon eller infusjonsteknikker. Preparatet kan tilføres parenteralt i utforminger av doseringsenheten som inneholder standard,
 30 velkjente, ikke toksiske, fysiologisk aksepterbare bærestoffer, adjuvanter og bærere etter behov.

Foretrukne sterile injiserbare preparater kan være løsninger eller suspensjoner i et ikke toksisk, parenteralt akseptabelt løsningsmiddel eller fortynningsmiddel. Eksempler
 35 på farmasøytisk aksepterbare bærestoffer er saltvann, bufret saltvann, isotont saltvann (for eksempel mononatrium- eller dinatriumfosfat, natrium-, kalium-, kalsium- eller magnesiumklorid eller blandinger av slike salter), Ringers løsning, dekstrose, vann,

sterilt vann, glyserol, etanol og kombinasjoner av disse. 1,3-butandiol og sterile, ikke-flyktige oljer anvendes med fordel som løsemidler eller suspensjonsmidler. Enhver mild, ikke-flyktig olje kan anvendes, innbefattet syntetiske mono- eller diglyserider. Fettsyrer som oljesyre kan også anvendes for fremstilling av injiserbare midler.

5

Mediet i preparatet kan også være en hydrogel, fremstilt av enhver biokompatibel eller ikkecytotoksisk (homo- eller hetero)-polymer, for eksempel en hydrofil polyacrylsyrepolymer, som kan virke som en medikamentabsorberende svamp. Slike polymerer beskrives for eksempel i patentsøknaden WO 93/08845. Visse av disse polymerene, særlig polymerer erholdt fra etylen- og/eller propylenoksyd, er
 10 kommersielt tilgjengelige. En hydrogel kan deponeres direkte på overflaten av vevet som skal behandles, for eksempel under et kirurgisk inngrep.

Et farmasøytisk preparat kan omfatte et replikasjonsdefisiente rekombinant virus og
 15 poloksamer. Nærmere bestemt et preparat som omfatter et replikasjonsdefisient rekombinant virus som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF-polypeptid og poloksamer. En foretrukket poloksamer er poloksamer 407, som er kommersielt tilgjengelig (BASE, Parsippany, NJ) og som er en ikke-toksisk, biokompatibel polyol og er mest foretrukket. En poloksamer impregnert med rekombinante virus kan deponeres
 20 direkte på vevets overflate som skal behandles, for eksempel under et kirurgisk inngrep. Poloksamer besitter i det vesentlige de samme fordeler som en hydrogel, mens viskositeten er lavere.

Foreliggende oppfinnelse gjelder også preparater som er anvendbare for fremstilling av
 25 medikamenter beregnet for behandling av individer som lider av en NFκB-regulert inflammatorisk respons og preparater som er anvendbare ved fremstilling av medikamenter beregnet på å forhindre at individer påvirkes av en NFκB-regulert inflammatorisk respons. Følgelig omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et NFIF-polypeptid ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament beregnet for
 30 behandling av og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons. Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av en nukleinsyre ifølge oppfinnelsen, som koder for et NFIF-polypeptid, for fremstilling av et medikament beregnet for behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons. Følgelig omfatter foreliggende oppfinnelse anvendelse av et NFIF-polypeptid
 35 ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament beregnet for behandling av og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons. Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av en defekt rekombinant viral vektor ifølge

oppfinnelsen for fremstilling av et medikament beregnet for behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

Det er også mulig å anvende preparater som omfatter celler som har blitt genetisk modifisert *ex vivo* med et rekombinant virus, og preparater som omfatter celler som inneholder slike rekombinante virus som er implantert i kroppen, noe som muliggjør langvarig og effektiv ekspresjon *in vivo* av et NFIF-polypeptid ifølge oppfinnelsen.

Terapeutiske forbindelser basert på NFIF som inhiberer aktivering av NFκB

10

Som forklart ovenfor er det i visse situasjoner vanskelig å redusere eller inhibere NFκB-regulerte immunresponsen. Ved å inhibere ekspresjonen av NFIF-genet eller å interferere med aktiviteten til NFIF-polypeptider er det mulig å inhibere induksjon av NFκB og derved inhibere eller forebygge NFκB-immunresponsen som fører til aterosklerose og andre sykdommer.

15

Det finnes en rekke terapeutiske forbindelser som kan anvendes for å inhibere NFIF-ekspresjon eller -aktivitet. Disse terapeutiske forbindelsene kan være nukleinsyrer, polypeptider, peptider eller små ikkepeptidmolekyler. I en utførelse anvendes "antisens"-nukleinsyrer til å redusere ekspresjonen av NFIF-genet ved inhibering av prosessering (splicing) av NFIF-primærtranskriptet. I en annen utførelse anvendes ribozymmer som spalter NFIF-mRNA og forhindrer syntese av NFIF. Polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter antistoffer eller andre bindende proteiner som bindes til NFIF-polypeptider og forstyrrer deres evne til å aktivere NFκB-induksjon. I tillegg kan forbindelser, for eksempel lavmolekylære inhibitorer som inhiberer NFIF-genekspresjonen eller aktiviteten til NFIF-polypeptider, identifiseres i rapportørgenanalyser som beskrevet ovenfor og tilføres til pasienter for inhibering av NFIF-ekspresjon/aktivitet. De samme fremgangsmåter som beskrives ovenfor for innføring av NFIF-polypeptider og nukleinsyrer som koder for NFIF-polypeptider i en pasients kropp anvendes for tilførsel av de forskjellige anti-NFIF-preparater.

30

"Antisens"-nukleinsyrer

Nedregulering av genekspresjon ved anvendelse av "antisens"-nukleinsyrer kan oppnås på translasjonsnivå eller transkripsjonsnivå. "Antisens"-nukleinsyrer ifølge oppfinnelsen er fortrinnsvis nukleinsyrefragmenter som kan hybridisere spesifikt med hele eller en del av en nukleinsyre som koder for NFIF eller det tilsvarende budbringer-

35

RNA. I tillegg kan det utformes eller påvises "antisens"-nukleinsyrer som reduserer ekspresjonen av NFIF-genet ved å inhibere spleising av primærtranskriptet. Med kjennskap til NFIF-genets struktur og deler av sekvensen kan slike "antisens"-nukleinsyrer utformes og analyseres for virkning.

5

"Antisens"-nukleinsyrene er fortrinnsvis oligonukleotider og kan bestå utelukkende av deoksyribonukleotider, modifiserte deoksyribonukleotider eller en kombinasjon av begge disse. "Antisens"-nukleinsyrene kan være syntetiske oligonukleotider. Oligonukleotidene kan om ønskelig være kjemisk modifisert for å forbedre stabiliteten og/eller selektiviteten. Siden oligonukleotider er utsatt for degradering ved
10 intracellulære nukleaser, kan modifikasjonene for eksempel omfatte anvendelse av en svovelgruppe som erstatning for det frie oksygen i fosfodiesterbindingen. Denne modifikasjonen kalles en fosforotioatbinding. Fosforotioat-"antisens"-oligonukleotider er vannløselige, polyanioniske og resistente overfor endogene nukleaser. Når et
15 fosforotioat-"antisens"-oligonukleotid hybridiserer til sitt målsete vil i tillegg RNA-DNA-dupleksen aktivere det endogene enzym ribonuklease (Rnase) H, som spalter mRNA-bestanddelen i hybridmolekylet.

I tillegg kan "antisens"-oligonukleotider med fosforamidit- og polyamid (peptid)-
20 bindinger syntetiseres. Disse molekyler bør være svært resistente overfor nukleasedegradering. Videre kan kjemiske grupper adderes til 2'-karbonet i sukkerresten og 5-karbonet (C-5) i pyrimidiner for å øke stabiliteten og lette binding av "antisens"-oligonukleotidet til målsetet. Modifikasjonene kan omfatte 2'-deoksy, O-pentoksy, O-propoksy, O-metoksy, fluor, metoksyetoksy-fosforotioater og modifiserte
25 baser, så vel som andre modifikasjoner som er kjente blant fagfolk.

"Antisens"-nukleinsyrene kan også være DNA-sekvenser hvis ekspresjon i cellen danner RNA som er komplementær til hele eller deler av NFIF-mRNA. "Antisens"-nukleinsyrer kan fremstilles ved ekspresjon eller en del av en sekvens utvalgt fra
30 gruppen som består av sekvensen i figur 3 i motsatt orientering, som beskrevet i EP 140308. "Antisens"-sekvenser av enhver lengde er egnede for utførelse av oppfinnelsen så lenge som de kan nedregulere eller blokkere ekspresjonen av NFIF. "Antisens"-sekvensen er fortrinnsvis minst 20 nukleotider lang. Fremstilling og anvendelse av "antisens"-nukleinsyrer, DNA som koder for "antisens"-RNA og anvendelse av oligo
35 og genetisk "antisens" beskrives i WO 92/15680.

En tilnærming for å bestemme det optimale NFIF-fragment for anvendelse i en behandlingsfremgangsmåte som omfatter "antisens"-nukleinsyrer omfatter fremstilling av tilfeldige fragmenter av NFIF-cDNA ved mekanisk oppbryting eller somatisk behandling og kloning av fragmentet inn i ethvert av vektorsystemene som beskrives heri. Enkeltkloner eller sammenslåtte kloner anvendes for infeksjon av NFIF-uttrykkende celler, og effektive "antisens"-NFIF-cDNA-fragmenter påvises ved å måle NFIF-ekspresjonen på RNA-nivå eller proteinnivå.

Retrovirusvektorsystemene, adenoassosiert virusvektorsystemene og adenovirusvektorsystemene som diskuteres heri ovenfor kan alle anvendes for innføring og ekspresjon av "antisens"-nukleinsyrer i celler. Syntetiske "antisens"-oligonukleotider kan innføres på en rekke forskjellige måter, innbefattet fremgangsmåtene som diskuteres heri nedenfor.

15 **Ribozymer**

Redusert nivå av NFIF-polypeptid kan oppnås ved anvendelse av ribozymer. Ribozymer er katalytiske RNA-molekyler (RNA-enzym) som har separate doméner for katalyse og substratbinding. Den substratbindende sekvens bindes via nukleotidkomplementaritet og, muligens, ikkehydrogenbindingsinteraksjoner med målsekvensen. Den katalytiske del spalter mål-RNA i et spesifikt sete. Substratdoménet i et ribozym kan utformes slik at det rettes mot en angitt mRNA-sekvens. Ribozymet gjenkjenner og bindes til et mål-mRNA via komplementær baseparing. Når det først er bundet til det korrekte målsetet, virker ribozymet enzymatisk slik at mål-mRNA spaltes. Spalting av NFIF-mRNA ved et ribozym ødelegger dets evne til å styre syntesen av NFIF-polypeptid. Når først ribozymet har spaltet sin målsekvens, frigis det og kan bindes til og spalte andre NFIF-mRNA gjentatte ganger.

Eksempler på ribozymer for anvendelse ved utførelse av foreliggende oppfinnelse, omfatter en rekke motiver, for eksempel hammerhodemotivet, hårnålsmotivet, et motiv fra hepatitt deltavirus, fra et gruppe I-intron eller fra RnaseP-RNA (sammen med en RNA-styringssekvens), eller Neurospora VS-RNA-motivet. Hammerhodemotiver beskrives av Rossi et al., 1992, *Aids Research and Human Retroviruses*, 8, 183. Hårnålsmotiver beskrives i Hampel og Tritz, 1989, *Biochemistry*, 28, 4929, og Hampel et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 299. Hepatitt deltavirusmotivet beskrives av Perrotta og Been, 1992, *Biochemistry*, 31, 16, RnaseP-motivet beskrives av Guerrier-Takada et al., 1983, *Cell*, 35, 849, Neurospora VS-RNA-ribozymmotivet beskrives

Collins (Saville og Collins, 1990, *Cell*, 61, 685-696; Saville og Collins, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 8826-8830; Collins og Olive, 1993, *Biochemistry*, 32, 2795-2799) og Gruppe I-intronmotivet beskrives av Cech et al., U.S. patentskrift nr. 4 987 071.

5

En tilnærming ved fremstilling av et ribozym er å syntetisere kjemisk et oligodeoksyribonukleotid med et katalytisk ribozymdoméne (tilnærmet 20 nukleotider) flankert av sekvenser som hybridiserer til NFIF-mål-mRNA etter transkripsjon. Oligodeoksyribonukleotidet amplifiseres ved anvendelse av substratbindingssekvensene som primere. Amplifiseringsproduktet kloner inn i en eukaryot ekspresjonsvektor.

10

Ribozymmer som besitter en hammerhodestruktur eller en hårnålsstruktur, fremstilles lett siden disse katalytiske RNA-molekylene kan uttrykkes i celler fra eukaryote promotere (se for eksempel Scanlon et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2,3-15; Dropulic et al., 1992, *J. Virol.*, 66,1432-41; Weerasinghe et al., 1991, *J. Virol.*, 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89,10802-6; Chen et al., 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 4581-9; Sarver et al., 1990, *Science*, 247, 1222-1225). Et ribozym ifølge foreliggende oppfinnelse kan uttrykkes i eukaryote celler fra en egnet DNA-vektor. Om ønskelig kan ribozymets aktivitet forsterkes ved at det frigis fra primærtranskriptet ved hjelp av et andre ribozym (Ohkawa et al., 1992, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 27, 15-6; Taira et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19, 5125-30; Ventura et al., 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 3249-55).

20

I en tilnærming for fremstilling av ribozymmer uttrykkes ribozymmer fra transkripsjonenheter som er innsatt i DNA vektorer, RNA-vektorer eller virusvektorer. Transkripsjon av ribozymsekvensene styres av en promoter for eukaryot RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II) eller RNA polymerase III (pol III). Transkripter fra pol I- eller pol III-promotere vil uttrykkes i høyt nivå i alle celler, mens nivået fra en gitt pol II-promoter i en gitt celletype vil avhenge av nærliggende genregulatoriske sekvenser. Prokaryote RNA polymerase-promotere anvendes også, forutsatt at det prokaryote RNA polymeraseenzym uttrykkes i angjeldende celler (Elroy-Stein og Moss, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6743-7; Gao og Huang 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 2867-72; Lieber et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217, 47-66; Zhou et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4529-37). Det har blitt vist at ribozymmer uttrykt fra disse promotere kan fungere i pattedyrceller (Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-6; Chen

35

et al., 1992 *Nucleic Acids Res.*, 20, 4581-9; Yu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, *EMBO J.*, 11, 4411-8; Lisiewicz et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8000-4).

- 5 I en utførelse av foreliggende oppfinnelsen innsettes en transkripsjonsenhet som uttrykker et ribozym som spalter NFIF-RNA i en plasmid-DNA-vektor, en retrovirusvektor, en adenovirusvektor eller en adenoassosiert virusvektor. De rekombinante vektorene er fortrinnsvis DNA-plasmider eller adenovirusvektorer. Imidlertid kan andre pattedyrcellevektorer som styrer ekspresjonen av RNA anvendes
- 10 for dette formål. Vektorene tilføres som rekombinante viruspartikler. DNA kan tilføres alene eller i kompleks med forskjellige bærere. DNA, DNA/bærerkomplekser eller rekombinante viruspartikler tilføres lokalt til setet som skal behandles, som diskutert nedenfor. Fortrinnsvis tilføres rekombinante vektorer som kan uttrykke ribozymene lokalt, som beskrevet nedenfor, og vedvarer i målcellene. Når de først uttrykkes spalter
- 15 ribozymene NFIF-mål-mRNA.

- Ribozymene kan tilføres til en pasient ved en rekke forskjellige fremgangsmåter. De kan tilsettes direkte til målvev, som komplekser med kationiske lipider, pakket i liposomer eller tilført til målcellene ved andre fremgangsmåter som er kjente innen
- 20 faget. Lokal tilførsel til de ønskede vev kan utføres ved hjelp av et kateter, en infusjonspumpe eller et stent, med eller uten innføring av ribozymet i biopolymerer, som diskutert heri nedenfor. Alternative tilførselsveier omfatter, men er ikke begrenset til, intravenøs injeksjon, intramuskulær injeksjon, subkutan injeksjon, aerosolinhalering, oralt (i tablett- eller pilleform), topisk, systemisk, okkult, intraperitonealt og/eller
- 25 intratekalt. Mer detaljerte beskrivelser av tilførsel av ribozymer gis i Sullivan et al., PCT WO 94/02595 og Draper et al., PCT WO 93/23569.

Antistoffer

- 30 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer antistoffer mot NFIF-polypeptidet. Disse antistoffene kan være monoklonale antistoffer eller polyklonale antistoffer. Foreliggende oppfinnelse omfatter kimære, enkeltkjedete og humaniserte antistoffer, så vel som Fab-fragmenter og produkter fra et Fab-ekspresjonsbibliotek, og Fv-fragmenter og produkter fra et Fv-ekspresjonsbibliotek.

35

Polyklonale antistoffer kan fremstilles mot et antigenisk fragment av et NFIF-polypeptid. Antistoffer kan også frembringes mot det intakte NFIF-protein eller

-polypeptid eller mot et fragment, derivat eller en epitop av proteinet eller polypeptidet. Antistoffer kan erholdes etter tilførsel av proteinet, polypeptidet, fragmentet, derivatet eller epitopen til et dyr ved anvendelse av teknikker og fremgangsmåter som er kjente innen faget.

5

Monoklonale antistoffer kan fremstilles ved anvendelse av fremgangsmåten til Mishell; B. B. et al., *Selected Methods In Cellular Immunology*, (W. H. Freeman, red.) San Francisco (1980). Kort beskrevet anvendes et polypeptid ifølge foreliggende oppfinnelse til immunisering av miltceller fra Balb/C-mus. De immuniserte miltcellene fusjoneres med myelomceller. Fusjonerte celler som har egenskaper fra miltceller og
10 myelomceller, isoleres ved dyrking i HAT-medium, et medium som dreper begge utgangscellene, men som tillater fusjonsproduktene å overleve og vokse.

De monoklonale antistoffer ifølge foreliggende oppfinnelse kan "humaniseres" for å
15 forhindre at verten utløser en immunrespons mot antistoffene. Et "humanisert antistoff" er et antistoff hvori de komplementaritetsbestemmende områder (CDR) og/eller andre deler av lettkjedens og/eller tungkjedens variable doménerammeverk er avledet fra et ikke menneskelig immunglobulin, mens resten av molekylet er avledet fra ett eller flere humane immunglobuliner. Humaniserte antistoffer omfatter også antistoffer som
20 særpreges ved en humanisert tungkjede forbundet med en ikkemodifisert donor- eller akseptor-lettkjede eller en kimær lettkjede, eller omvendt. Humanisering av antistoffer kan oppnås ved fremgangsmåter som er kjente innen faget (se for eksempel G. E. Mark og E. A. Padlan, "kapittel 4, Humanization of Monoclonal Antibodies", *The Handbook of Experimental Pharmacology*, bind 113, Springer-Verlag, New York, 1994).
25 Transgene dyr kan anvendes for ekspresjon av humaniserte antistoffer.

Teknikker som er kjente innen faget for fremstilling av enkeltkjedete antistoffer, kan tilpasses fremstilling av enkeltkjedete antistoffer rettet mot de immunogene polypeptidene og proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse.

30

Anti-NFIF-antistoff kan anvendes for å bindes til og inhibere aktiviteten av NFIF i en pasient.

Anti-NFIF-antistoffene er også anvendbare i analyser for påvisning eller kvantifisering
35 av NFIF-nivået. I en utførelse tilveiebringer disse analysene en klinisk diagnose og et anslag av NFIF i forskjellige sykdomstilstander og en fremgangsmåte for måling av virkningen av behandling. Et eksempel på et anti-NFIF-antistoff anvendt for å bindes til

NFIF og påvise dets nærvær i vev, gis i eksempel 5. Disse anti-NFIF-antistoffene kan i tillegg anvendes for kvantifisering av NFIF i en vevsprøve.

Behandlingsfremgangsmåter

5

Behandlingsfremgangsmåter som omfatter tilførsel til et menneske eller et annet dyr av en effektiv mengde av et preparat er mulig å gjennomføre.

Effektive mengder kan variere avhengig av alder, type og omfang av tilstanden som skal
10 behandles, pasientens kroppsvekt, den ønskede varighet av behandlingen, tilførselsfremgangsmåten og andre parametere. Effektive mengder bestemmes av en lege eller av et kvalifisert medlem av en annen medisinsk profesjon. I de fleste tilfeller kan doseringsnivået justeres slik at det ønskede nivå av NFIF eller andre terapeutiske forbindelser kan oppnås og opprettholdes.

15

Polypeptider ifølge oppfinnelsen tilføres generelt i doser på fra tilnærmet 0,01 mg/kg til tilnærmet 100 mg/kg, mer foretrukket fra tilnærmet 0,1 mg/kg til tilnærmet 50 mg/kg, og enda mer foretrukket fra tilnærmet 1 mg/kg til tilnærmet 10 mg/kg kroppsvekt pr. dag.

20

Nøytraliserende antistoffer ifølge oppfinnelsen kan tilføres som en enkelt bolusinjeksjon, infiseres over tid eller både tilføres som en bolusinjeksjon og infiseres over tid. Selv om doseringsmengden vil variere avhengig av parametrene ovenfor og antistoffets bindingsevne, kan en dose fra 0,2 til 0,6 mg/kg gis som en bolusinjeksjon,
25 fulgt av en infusjonsperiode på 2 til 12 timer. Alternativt tilføres flere bolusinjeksjoner hver annen dag, eller hver tredje til fjerde dag etter behov. Doseringsnivået kan justeres ut fra NFIF-nivået og/eller NFκB-induksjonsnivået.

Som diskutert heri ovenfor kan rekombinante virus anvendes for innføring av både

30 DNA som koder for NFIF og subfragmenter av NFIF, så vel som "antisens"-nukleinsyrer. Rekombinante virus er generelt utformet og tilført i form av doser på mellom tilnærmet 10^4 og tilnærmet 10^{14} pfu. For AAV og adenovirus anvendes fortrinnsvis doser på fra tilnærmet 10^6 til tilnærmet 10^{11} pfu. Begrepet pfu ("plakkdannende enhet") tilsvarer infeksjonsevnen til en viruspartikkelsuspensjon og
35 bestemmes ved å infisere en egnet cellekultur og måle antall dannede plakk. Teknikker for bestemmelse av pfu-titeret i en virussuspensjon er godt dokumenterte innen teknikkens stand.

Ribozymer ifølge foreliggende oppfinnelse kan tilføres i mengder som varierer fra tilnærmet 5 til tilnærmet 50 mg/kg/dag i et farmasøytisk aksepterbart bærestoff. Dosenivået kan justeres basert på den målte terapeutiske virkning.

5

Egnede nivåer av inhibitor- eller enhancermolekyler kan bestemmes av kvalifisert medisinsk personell ved anvendelse av parametrene diskutert ovenfor.

Fremgangsmåter for å øke nivået av NFIF-polypeptidaktivitet

10

Fremgangsmåtene for å øke ekspresjonen eller aktiviteten av NFIF-polypeptid, er mulig ved tilførsel av et preparat som omfatter et NFIF-polypeptid, tilførsel av et preparat som omfatter en ekspresjonsvektor som koder for NFIF-polypeptidet, tilførsel av et preparat som omfatter et enhancermolekyl som forsterker aktiviteten av NFIF-polypeptidet, og
15 tilførsel av et enhancermolekyl som gir øket ekspresjon av NFIF-genet.

Fremgangsmåter som benytter NFIF-polypeptider

Å forhøye nivået av NFIF-aktivitet ved tilførsel av et preparat som omfatter NFIF-polypeptidet er mulig. Dette preparat kan tilføres på en egnet måte, for eksempel oralt, topisk, intravenøst, intraperitonealt, intramuskulært, subkuttant, intranasalt eller intradermalt. Preparatet kan tilføres direkte eller være innkapslet (for eksempel i et lipidsystem, i aminosyremikrokuler eller i globulære dendrimerer). Polypeptidet kan i
20 noen tilfeller være koblet til en annen polymer, for eksempel serumalbumin eller
25 polyvinylpyrrolidon.

Fremgangsmåter som benytter vektorer som uttrykker NFIF

NFIF-nivået kan forhøyes ved anvendelse av genterapi, dvs. ved tilførsel av et preparat
30 som omfatter en nukleinsyre som koder for og styrer ekspresjonen av NFIF-polypeptidet. I denne utførelse klones NFIF-polypeptidet i en egnet ekspresjonsvektor. Mulige vektorsystemer og promotere diskuteres i omfattende grad ovenfor. Ekspresjonsvektoren innføres i målvevet ved anvendelse av et av vektortilførselssystemene som diskuteres ovenfor. Denne innføringen utføres enten *ex vivo*, i en fremgangsmåte hvori nukleinsyren innføres i celler i laboratoriet og de modifiserte cellene så tilføres til mennesket eller et annet dyr, eller *in vivo*, i en fremgangsmåte hvori nukleinsyren overføres direkte til celler i mennesket eller et annet

dyr. Det kan anvendes et adenovirusvektorsystem for levering av ekspresjonsvektoren. Om ønskelig benyttes en vevsspesifikk promoter i en ekspresjonsvektor, som beskrevet ovenfor.

- 5 Ikke virale vektorer kan innføres i celler ved anvendelse av enhver av teknikkene som er kjent innen faget, innbefattet kalsiumfosfatutfelling, lipofeksjon (syntetiske anioniske og kationiske liposomer), reseptorformidlet gentilførsel, injeksjon av nakent DNA, elektroporering og ved bioballistiske teknikker eller partikkelakselerasjon.

10 **Fremgangsmåter som benytter et enhancermolekyl som forsterker aktiviteten av NFIF**

NFIF-aktiviteten kan også forsterkes ved enhancermolekyler som forhøyer NFIF-aktiviteten eller forbedrer cellulære bindingsseters gjenkjenning av NFIF. Disse
15 enhancermolekylene kan innføres ved de samme fremgangsmåter som diskuteres ovenfor for tilførsel av polypeptider.

Fremgangsmåter som benytter et enhancermolekyl som forhøyer NFIF-genekspresjonen

20 NFIF-nivået kan forhøyes ved anvendelse av lavmolekylære forbindelser som kan oppregulere NFIF-ekspresjonen på transkripsjonsnivå, translasjonsnivå eller posttranslasjonsnivå. Disse forbindelsene kan tilføres ved de samme fremgangsmåter som diskuteres ovenfor for tilførsel av polypeptider.

25 **Fremgangsmåter for behandling eller forhindring av NFκB-regulert inflammatorisk respons**

Fremgangsmåter for behandling eller forhindring av NFκB-regulerte inflammatoriske
30 responser er mulig og kan omfatte reumatoid artritt, aterosklerose, autoimmune sykdommer, virussykdommer, NSAID-indusert gastropati, neurodegenerative sykdommer, skrapesyke, sepsis, apoptose, Crohn's sykdom, nyresykdom, restenose, hjerneskade/inflammasjon, Alzheimers sykdom, astma og feilregulert ekspresjon av pleiotrope cytokiner.

35 Disse fremgangsmåtene kan omfatte tilførsel av et preparat som omfatter en "antisens"-nukleinsyre, tilførsel av et preparat som omfatter et intracellulært bindende protein, for

eksempel et antistoff, tilførsel av et inhiberende molekyl som inhiberer NFIF-aktiviteten, for eksempel et preparat som omfatter en ekspresjonsvektor som koder for et subfragment av NFIF eller et lavmolekylært molekyl, innbefattet tilførsel av en lavmolekylær forbindelse som nedregulerer NFIF-ekspresjonen på transkripsjonsnivå, 5 translasjonsnivå eller posttranslasjonsnivå, tilførsel av et ribozym som spalter mRNA som koder for NFIF, tilførsel av et medikament fremstilt ved anvendelse av et NFIF-polypeptid, tilførsel av et medikament fremstilt ved anvendelse av en nukleinsyre som koder for et NFIF-polypeptid, tilførsel av et medikament fremstilt ved anvendelse av en rekombinant vektor som omfatter nukleinsyre som koder for et NFIF-polypeptid, og 10 tilførsel av et medikament fremstilt ved anvendelse av en defekt rekombinant virusvektor som omfatter nukleinsyre som koder for et NFIF-polypeptid.

Fremgangsmåter for å redusere nivået av NFIF-polypeptidaktivitet

15 Fremgangsmåtene for å redusere ekspresjonen av NFIF-polypeptid for å redusere NFκB-induksjon kan omfatte tilførsel av et preparat som omfatter en "antisens"-nukleinsyre, tilførsel av et preparat som omfatter et intracellulært bindende protein, for eksempel et antistoff, tilførsel av et inhiberende molekyl som inhiberer NFIF-aktiviteten, for eksempel et preparat som omfatter en ekspresjonsvektor som koder for 20 et subfragment av NFIF eller et lavmolekylært molekyl, innbefattet tilførsel av en lavmolekylær forbindelse som nedregulerer NFIF-ekspresjonen på transkripsjonsnivå, translasjonsnivå eller posttranslasjonsnivå, og tilførsel av et ribozym som spalter mRNA som koder for NFIF.

Fremgangsmåter som benytter "antisens"-nukleinsyrer

Preparat som omfatter en "antisens"-nukleinsyre for nedregulering eller blokkering av NFIF-ekspresjonen er også mulig. Nukleinsyren kan kode for "antisens"-RNA-molekyler, da er nukleinsyren operativt koblet til signaler som muliggjør ekspresjon av 30 nukleinsyre sekvensen, og innføres fortrinnsvis i en celle ved å benytte rekombinante vektorkonstruksjoner som vil uttrykke "antisens"-nukleinsyren når først vektoren er innført i cellen. Eksempler på egnede vektorer omfatter plasmider, adenovirus, adenoassosierte virus, retrovirus og herpesvirus. Vektoren kan fortrinnsvis være et adenovirus. Best egnet er vektoren et replikasjonsdefisient adenovirus som omfatter en 35 delesjon i E1- og/eller E3-området i viruset.

"Antisens"-nukleinsyren kan være syntetisert og kan være kjemisk modifisert for å unngå degradering ved intracellulære nukleaser, som diskutert ovenfor. Syntetiske "antisens"-oligonukleotider kan innføres i en celle ved anvendelse av liposomer. Opptaket i cellen skjer dersom et "antisens"-oligonukleotid " er innkapslet i et liposom.

5 Med et effektivt tilførselssystem kan lave, ikke toksiske konsentrasjoner av "antisens"-molekylet anvendes for inhibering av translasjonen av mål-mRNA. Videre styrer liposomer som er konjugert til cellespesifikke bindingssteder et "antisens"-oligonukleotid til et gitt vev.

10 **Fremgangsmåter som benytter nøytraliserende antistoffer og andre bindende proteiner**

Nedregulering eller blokkering av NFIF-ekspresjonen ved ekspresjon av en nukleinsyresekvens som koder for et intracellulært, bindende protein som selektivt kan

15 interagere med NFIF er mulig. WO 94/29446 og WO 94/02610, beskriver cellulær transfeksjon med gener som koder for et intracellulært bindende protein. Et intracellulært bindende protein omfatter ethvert protein som selektivt kan interagere med eller bindes til NFIF i cellen hvor det uttrykkes og som kan nøytralisere funksjonen av bundet NFIF. Det intracellulært bindende protein er fortrinnsvis et nøytraliserende

20 antistoff eller et fragment av et nøytraliserende antistoff, det intracellulært bindende protein kan også være et enkeltkjedet antistoff.

WO 94/02610 beskriver fremstilling av antistoffer og påvisning av nukleinsyren som koder for et gitt antistoff. Ved anvendelse av NFIF eller et fragment derav, fremstilles et

25 spesifikt monoklonalt antistoff ved teknikker som er kjente blant fagfolk. En vektor som omfatter nukleinsyren som koder for et intracellulært bindende protein eller en del derav og som kan uttrykkes i en vertscelle, fremstilles så for anvendelse.

Alternativt kan NFIF-aktivitet blokkeres ved tilførsel av et nøytraliserende antistoff i

30 sirkulasjonen. Et slikt nøytraliserende antistoff kan tilføres direkte som et protein eller uttrykkes fra en vektor (med et sekretorisk signal).

Fremgangsmåter som benytter et inhiberende molekyl som forhindrer NFIF-genekspresjon

35 I en annen utførelse kan inhiberende molekyler, innbefattet lavmolekylære forbindelser, nedregulere NFIF-ekspresjonen på transkripsjonsnivå, translasjonsnivå eller

posttranslasjonsnivå. For påvisning av slike inhiberende molekyler kan rapportørgensystemene beskrevet ovenfor anvendes. Disse inhiberende molekylerne kan kombineres med et farmasøytisk aksepterbart bærerstoff og tilføres ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter som er kjente innen faget.

5

Fremgangsmåter som benytter ribozym

Ribozym kan tilføres til celler ved innkapsling i liposomer ved iontoforse, ved innføring i hydrogeler, syklodekstriner, biodegraderbare nanokapsler og bioadhesive mikrokuler, eller ved hvilken som helst av en rekke andre fremgangsmåter som diskuteres ovenfor. Ribozymet kan tilføres til et målvev ved direkte injeksjon eller ved anvendelse av et kateter, en infusjonspumpe eller et stent. Alternative tilførselsveier omfatter intravenøs injeksjon, intramuskulær injeksjon, subkutan injeksjon, aerosolinhalering, oral tilførsel (i tablett- eller pilleform), topisk, systemisk, okular, intraperitoneal og/eller intratekal tilførsel. I foretrukne utførelser klones en ribozymkodende sekvens i en DNA-ekspresjonsvektor. Transkripsjon av ribozymsekvensen styres av en promoter for eukaryot RNA polymerase II (pol II) eller RNA polymerase III (pol III). Ekspresjonsvektoren kan innføres i en rekke vektorer innbefattet virus-DNA-vektorer som adenovirusvektorene eller adenoassosiert virusvektorene som diskuteres ovenfor.

Det er mulig å innsette en transkripsjonsenhet som uttrykker et ribozym som spalter NFIF-RNA i en adenovirusvektor. Vektoren tilføres som rekombinante viruspartikler og tilføres lokalt til behandlingsstedet ved hjelp av et kateter, et stent eller en infusjonspumpe.

25

Eksempler og Referanseeksempler

Eksempel 1 - Fremgangsmåte for kloning av NFIF-14b- og NFIF-7a

30

For isolering av DNA som koder for NFIF-14b- og NFIF-7a ved et cDNA-bibliotek, fremstilt fra total-RNA fra humane, vaskulære, glatte muskelceller (SMC) ved anvendelse av et "maraton" cDNA-biblioteksyntesett fra Clontech. cDNA-syntesettet omfatter også et kontroll-DNA-bibliotek fra human placenta. Bibliotekene er lineære og kan amplifiseres ved PCR.

35

Genene for NFIF-14b- og NFIF-7a ble erholdt vedd PCR utført på de to "maraton"-bibliotekene fra Human Vascular SMC og Human Placenta cDNA.

- For utførelse av PCR-reaksjonene ble standard PCR-bestanddelene [Perkin Elmer 10X buffer og Taq Gold Polymerase] anvendt, og reaksjonen ble utført som følger.
- Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 94 °C i 10 minutter og så sendt gjennom 10 sykluser med et denatureringstrinn ved 94 °C i 30 sekunder, et hybridiseringstrinn ved 65 °C i 30 sekunder og et forlengelsestrinn ved 72 °C i 1,5 minutter. Etter disse 10 syklusene ble reaksjonsblandingen sendt gjennom 30 sykluser bestående av et
- denatureringstrinn ved 94 °C i 30 sekunder, et hybridiseringstrinn ved 46 °C i 30 sekunder og et forlengelsestrinn ved 72 °C i 1,5 minutter. Etter disse 30 syklusene ble reaksjonsblandingen inkubert ved 72 °C i 7 minutter og lagret ved 4 °C. PCR-reaksjonene ble utført i en Perkin Elmer 9600 programmerbar varmeblokk.
- PCR-produktet fra hver reaksjon ble ligert inn i pCR2.1 (Invitrogen) og transformert inn i E. Coli DH5α. Kloner ble plukket og dyrket i 5 ml LB-amp, plasmider ble så isolert og kuttet med EcoRI for kontroll av det frigitte innskudds størrelse. Fem av femten kloner ga bånd med størrelse 1,2-1,3 Kb, som forventet for målgenet og ble sekvensert.
- Mulige NFIF-kloner ble påvist, basert på en åpen leseramme og sekvenssammenstilling av sekvensen mot en utledet 5'-sekvens. Klon 14b og 7a ble utvalgt for videre karakterisering.

- For fremstilling av plasmid i stor skala ble bakteriene oppdyrket fra de opprinnelige glyserollagersuspensjoner av klon 7 og 14 og isolert ved anvendelse av et Qiagen MaxiPrep-sett.

Eksempel 2 - Subkloning av klon 7a og 14b i en eukaryot ekspresjonsvektor

- Klon 14b og 7a ble videre subklonet i plasmidvektoren pcDNA3.1myc-his tilgjengelig fra Invitrogen. Denne ekspresjonsvektoren omfatter en kraftig promotor for ekspresjon i høyt nivå i pattedyrsceller og en seleksjonsmarkør for dannelsen av stabile cellelinjer. En C-terminal fusjonsmerkelapp i vektoren omfatter en polyhistidinsekvens for hurtig rensing og en myc-epitop for enkel påvisning med et anti-myc-antistoff.

35

PCR-reaksjonene ble utført ved anvendelse av PCR-primerene

5'hasm - 5'-tccaccatggcgctggtgcgcgcactc-3' (SEQ. ID. No. 6),

fushasm3' - 3'-ctggatatcgtgaattgtgctttatataaagctg-5' (SEQ. ID No. 7) og med pCR2.1-konstruksjonen for hver fullengde klon som templat. PCR-betingelsene for anvendelse av 475 pg av pCR2.1 klon 7a eller 500 pg av pCR2.1 klon 14b var som følger: Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 95 °C i 10 minutter og så sendt gjennom
 5 30 sykluser bestående av et denatureringstrinn ved 95 °C i 30 sekunder, et hybridiseringstrinn ved 52 °C i 30 sekunder og et forlengelsestrinn ved 72 °C i 1,5 minutter. Etter disse 30 syklusene ble reaksjonsblandingen inkubert ved 72 °C i 7 minutter og lagret ved 4 °C.

10 PCR-produktet ble ligert inn i pCR2.1 og innskudds-DNA sekvensert ved benyttelse av Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction og et Perkin Elmer Applied Biosystems ABI Prism 377 DNA-sekvenseringsinstrument. Sekvenseringen viste at PCR-primeren fjernet det naturlige stoppkodon (TAG) og innførte et EcoRV-sete.

15 De positive konstruksjonene av NFIF-14b- og NFIF-7a ble kuttet med EcoRI og EcoRV og subklonet i pcDNA3.1 myc-his (Invitrogen) kuttet med EcoRI og EcoRV. Dette førte til at myc-merkelappen ble fusjonert til den 3'ende av NFIF-cDNA. Disse konstruksjonene ble betegnet pcDNA3.1mychasm7a og pcDNA3.1hasm14bmyc.

20 **Eksempel 3 - Fremstilling av delesjonsvarianter av NFIF**

Delesjonsvarianter av NFIF-14b- og NFIF-7a ble fremstilt ved PCR-reaksjoner med fosmidene pcDNA3.1mychasm7a og pcDNA3.1hasm14bmyc, beskrevet ovenfor. To sett med PCR-primere ble anvendt for fremstilling av delesjonsmutantene:

25 hasm313mut + hasm3'mut:

5' gctccaccatgatatggacaggggatag 3' (SEQ. ID. No. 8)

5' gccactgtgctggatatcgtaattaac 3' (SEQ. ID. No. 9)

hasm396mut + hasm3'mut:

5' gctccaccatgacaaccaccatccagagtc 3' (SEQ. ID. No. 10)

30 5' gccactgtgctggatatcgtaattaac 3' (SEQ. ID. No. 9)

Primerparet hasm31+hasm3'mut ga en sekvens som var identisk med sekvensen til fullengdeklonen av 14b- eller 7a-cDNA, men med en åpen leseramme som innledes nedstrøms for basepar 313 (ATG). (Nummereringen er fra ATG i fullengdeklonen).

35 Kozac-konsensus sekvensen inngikk i foroverprimeren for optimalisering av translasjonen.

Primerparet hasm396+hasm3' mut ga en sekvens som var identisk med sekvensen til fullengde-cDNA, men med en åpen leseramme initiert nedstrøms ved basepar 394 (ATG).

- 5 PCR-produktene ble ligert inn i pCR2.1 og innskudds-DNA sekvensert. Hver av delesjonsmutantene ble kuttet med EcoRI/EcoRV og subklonet inn i pcDNA3.1mychis kuttet med EcoRI og EcoRV. NFIF-14b-delesjonkloner med korrekt sekvens ble betegnet pcDNAMychis 14-313 og pcDNAMychis 14-396. NFIF-7a-delesjonskloner med korrekt sekvens ble betegnet pcDNAMychis 7-313 og pcDNAMychis 7-396.

10

- Analyse av klonene ovenfor ved anvendelse av *in vitro* transkripsjon/translasjon og innføring av [³⁵S-metionin] i reaksjonen [Promega TnT Quick Coupled Transcription Translation kit, kat.nr L1170] ga bånd av forventet størrelse (NFIF 14b = 51 kDa; NFIF 14-313 = 40 kDa; NFIF 14-396 37 kDa; NFIF 7a = 41 kDa; NFIF 7-313 = 30 kDa; og
15 NFIF 7-396 = 27 kDa) for forkortede åpne leserammer. Muligheten for translasjon var viktig å fastslå før den funksjonelle aktivitet ble anslått og før det ble bestemt hvilke doméner som var viktige for aktivitet.

Eksempel 4 - Fremgangsmåte for transfeksjon av celler med NFIF-14b- eller NFIF-7a for fremstilling av stabile cellelinjer inneholdende plasmider

20

- For fremstilling av stabile cellelinjer inneholdende NFIF-14b, NFIF-7a og delesjonsmutantene, ble 2 x 10⁵ HEK293 eller COS7-celler utsådd i 6-brønners Falcon-plater, og de endelige NFIF-cDNA-konstruksjonene pcDNAMychis7, pcDNAMychis7-
25 313, pcDNAMychis7-396; pcDNAMychis14, pcDNAMychis14-313, pcDNAMychis14-396 (0,8 µg) ble transfektert inn i cellene sammen med rapportørgenvektoren pNFκB-Luc fra Stratagene (0,1 µg) og vektoren EGFP fra Clontech (0,1 µg) ved anvendelse av 6 µl lipofektamin og 200 µl Optimem (med 800 µl frisk Optimem/brønn). Transfeksjonsreaksjonen ble inkubert i 4 timer ved 37 °C, hvorefter komplett medium
30 ble tilsatt til platene (3 ml).

- 24, 48 og 72 timer etter transfeksjonen ble det fremstilt lysater ved anvendelse av 200 µl 1 x rapportørlysis bufferløsning (E397A-Promega). Lysatene ble inkubert i 20 minutter på is og vorteksert, og så sentrifugert ved 12 000 rpm. i 5 minutter. Supernatanten ble
35 anvendt for måling av luciferaseaktivitet ifølge instruksjonene i rapportørgensettet pNFκB-luc fra Stratagene.

for fremstilling av stabile cellelinjer ble duplikater av kulturene ovenfor, etter 48 timer, oppsplittet i et forhold på 1:100 i komplett dyrkingsmedium sammen med G418 for seleksjon av celler som hadde inkorporert plasmidene i sitt DNA. Enkeltcellekloner ble isolert og overført til 48-brønners dyrkingsskåler for oppvekst. Kloner ble utvalgt ut fra deres aktivitet i NF κ B-luciferaserapportøranalysen.

Luciferaseaktiviteten ble målt i cellelysaten fra alle de forbigående transfekterte cellelinjene. 20 μ l lysat ble tilsatt til en 96-brønners, hvit Costar-seroclusterplate (nr. 3789) med rund bunn. 100 μ l luciferasereagens (Promega E1501) ble tilsatt umiddelbart før avlesing av prøven i en 1450 Microbeta Walko jet plateleser.

Analyse av resultatene fra 24 timer, 48 timer og 72 timer etter transfeksjonen viste at prøvene tatt etter 48 timer var de mest optimale for måling av aktivitet. Den positive kontroll for analysen var en 24 timers stimulering av cellene med tumor nekrosefaktor (α) (TNF α) en dag etter transfeksjon med vektoren pcDNA3.1mychis. I HEK293-celler ga forbigående transfeksjoner med fullengde pcDNAmychis7 et luminometertall pr. sekund som lå tilnærmet 3,1 ganger henholdsvis tilnærmet 2,1 ganger over verdien oppnådd med vektor alene (figur 5), og i COS7-celler (figur 6) ga fullengdeklon pcDNAmychis7 et signal som var 2,4 ganger og pcDNAmychis14 et luminometertall pr. sekund som var 2,3 ganger høyere enn signalet oppnådd med vektor alene.

Delesjonsmutantene (pcDNAmychis 7-313, pcDNAmychis 7-396, pcDNA mychis 14-313 og pcDNAmychis 14-396) viste redusert aktivitet. Analyser utført på andre dager ved anvendelse av prøvene tatt etter 48 timer ga en variabilitet i responsen som varierte mellom 2-5 gangers økning for klon 7 (fullengde) og 2-4 ganger for klon 14.

Eksempel 5 - Påvisning av vev som uttrykker eller inneholder NFIF-proteiner

For å fastslå hvilke humane vev som uttrykker NFIF-proteinene, ble et ferdiglaget northern blot fra Clontech (human 12 spor nr. 7780-1) analysert med tilfeldig primede, ³²P-merkede prober fremstilt fra NFIF. Resultatene kan ses i figur 8. Som figur 8 viser, er NFIF-ekspressjon spesielt åpenbar i skjelettmuskel, nyre, lever og placentavev.

For å fastslå hvorvidt NFIF-proteinet var forbundet med sykdomstilstander, innbefattet aterosklerose, som omfatter inflammasjon og for påvisning av vev som kan behandles ved anvendelse av fremgangsmåtene, ble en immuncytokjemisk undersøkelse utført ved anvendelse av et monoklonalt antistoff fra kanin betegnet 99-06, rettet mot et

peptidantigen (SKGANASNPFGDV) (SEQ. ID. No. 5) avledet fra aminosyrerestene 65 til 79 i NFIF-proteinet. Peptidet ble syntetisert i 0,25 mmol skala ved anvendelse av fast fase metodologi Fmoc (9-fluorenylmetyloksykarbonyl)-beskyttelsesskjema i forbindelse med HOBt/HBTU-aktiveringskjemi (Fields et al.,
 5 *Peptide Research*, 4:95-101 (1991)). Et Applied Biosystems 433 peptidsynteseinstrument som benyttet Applied Biosystems Fast-Moc-koblingssykluser, ble anvendt for syntese av peptidet.

Peptidet ble kløyyvet i 1,5 timer ved romtemperatur ved anvendelse av et
 10 kløyvingsreagens som besto av 82,5% trifluoreddiksyre (TFA), 5% fenol, 5% H₂O, 5% tioanisol og 2,5% etanditiol (King et al., *Intl. J. Peptide and Protein Research*, 36, 255-266 (1990)). Etter kløyvingen ble peptidet utfelt med tert-butyleter, vasket og tørket i en time under vakuum. Peptidet ble så solubilisert i 0,1% TFA/vann og renset ved anvendelse av C18 revers fase-HPLC. En renhetsgrad på >95% ble oppnådd for
 15 peptidet, sammen med korrekte MALDI-TOF-molekylvektresultater.

10-30 mg renset peptid ble konjugert til "keyhole limpet"-hemocyanin ved anvendelse av 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC). Preparatet ble grundig dialysert mot PBS ved 4 °C. Hapten/bærerpreparatet ble blandet 1:1 med Freund's komplette
 20 adjuvans og anvendt for injeksjon av kaniner for produksjon av antiserum mot peptidet. Peptidet på 15 aminosyrerester ble anvendt for fremstilling av anti-NFIF-antistoffer i kaniner ved anvendelse av standard fremgangsmåter som er kjente innen faget. Kaninene ble immunisert ved subkutan injeksjon med en emulsjon av antigen/komplett Freund's adjuvans (50% antigenløsning/50% komplett Freund's adjuvans). Komplett
 25 Freund's adjuvans (CFA) ble anvendt for den innledende immunisering, siden denne adjuvans har blitt anvendt med svært gode resultater for utløsning av antistoffresponser mot et bredt utvalg av protein- og peptidantigener, samtidig som forekomsten av uønskede reaksjoner er minimal eller ingen. Injeksjonsskjemaet beskrevet ovenfor har blitt optimalisert for anvendelse med Freund's adjuvans. Området som skulle injiseres
 30 ble barbert for å muliggjøre visuell vurdering av evt. reaksjoner på emulsjonen. Før injeksjonen ble injeksjonssetene vasket med fortynnet Nolvasan-vaskeløsning. Injeksjonssetene var på ryggen med start mellom skulderbladene. Injeksjonssetene lå langt fra hverandre og ble holdt nær midtlinjen for å redusere muligheten for at dyret skulle klø seg på injeksjonssetene. Typisk ble 100 µl inneholdende 20 µg antigen
 35 injisert i 5 subkutane seter pr. kanin for en totaldose på 100 µg/kanin. Deretter ble forsterkerinjeksjoner gitt med 4 ukers mellomrom med en emulsjon av antigen/ukomplett Freund's adjuvans. Etter 6 uker ble 5-30 ml blod oppsamlet for

bestemmelse av antistofftiteret. Dersom antistofftiteret ikke var tilstrekkelig ble ytterligere forsterkerinjeksjoner gitt med en ukes mellomrom og blodprøver oppsamlet hver andre til hver fjerde uke. Før hver antigeninjeksjon ble de tidligere injeksjonsseters tilstand evaluert for uønskede reaksjoner. Dyr som ga positiv antistoffrespons ble holdt i live og gitt forsterkerinjeksjoner og tappet for blod regelmessig for frembringelse av et stort antiserumlager.

Antistofftitreringseksperimenter ble utført med antistoff 99-06 for å etablere konsentrasjoner som gir minimal bakgrunn og maksimal påvisning av signal. En seriefortynningsundersøkelse viset det høyeste signal/støyforhold ved en fortynning på 1:500 og 1:1000, og objektglass inkubert med disse antistoffkonsentrasjonene ble analysert av patologene. Antistoff 99-06 ble anvendt som primærantistoff, og det viktigste deteksjonssystem besto av et vektor ABC-AP-sett (AK5002) med et Vektor Red substratsett som ga en rødfarget utfelling (SK-5100). Vevene ble også farget med et positivt kontrollantistoff (CD31) rettet mot det humane leukocyttantigen (Stockinger et al., *J. Immunol.*, 145(11):3889-97 (1990)) for å sikre at vevsantigenene var bevarte og tilgjengelige for immuncytokjemisk analyse. I tillegg til kransarterieprøver, var andre vev som ble farget og analysert under fase II av denne undersøkelsen normal milt, brissel og lymfeknute. Farging ble utført i milt, brissel og lymfeknute som et bidrag til påvisning av inflammatoriske underpopulasjoner av celler som uttrykte dette protein.

I milt, brissel og lymfeknute viste antistoff 99-06 kraftig positiv farging i lymfocytene i det periarterielle lymfesjikt, Billroth-båndene, corticale brissellymfocytter, terminalsenterceller i lymfeknuten og i vaskulært endotel og glattmuskel. Andre celletyper som ble farget middels til kraftig positivt med dette antistoff, omfatter Schwann-celler og hjertemyocytter. Signalet var hovedsakelig i kjernen i de undersøkte celletypene, bortsett fra at cytoplasmatisk granularitet ble observert i glatte muskelceller og i makrofager som var fylt med cellerester i plakkområder eller med trombedannelse.

I normale kransarterier var antistoffet hovedsakelig negativt i endotel i tunica intima, bortsett fra at enkelte celler viste et kjernesignal og myointimale glatte muskelceller viste svake kjernesignaler. I tunica media var antistoffet middels, jevnt positivt i glatte muskelceller. I adventitia, endotelet, ga vaskulære glatte muskelceller og inflammatoriske celler moderat positiv farging. De interne og eksterne elastiske lameller ga negativ farging.

I prøvene fra minimal aterosklerose viste endotelet bare av og til svake signaler, selv i den delen av endotelet som lå over ateromen. I den overfladiske aterom viste bare de myointimale glatte muskelcellene svake signaler. I dypere områder av ateromen viste prolifererende fibroblastformer og skummakrofager forhøyet nivå av farging. I noen prøver som viste plakk som inneholdt kolesterol og områder med forkalkning, viste de glatte muskelcellene og skumhistiocyttar som lå rundt de kolesterolfylte plakk og det forkalkede materialet, forhøyet nivå av farging.

I prøvene fra moderat aterosklerose viste endotelet, både i tunica intima og i områder med neovascularisering, forhøyet farging med antistoff 99-06. Inflammatoriske celler som lå langs kanten av eller nær endotelet ga kraftig positiv farging. Endotel som bekledde nye kar, ga moderat til kraftig positiv farging, og i områder var subendotelfibroblastene mindre positive enn det assosierte endotel. Generelt var fibroblastiske former av myointimale celler mye mindre positive enn både prolifererende og histiocyttiske former av glatte muskelceller. I tillegg viste makrofager forbundet med kolesterol, forkalkning eller skummakrofager i plakk, forhøyet nivå av farging. Glatt muskel i tunica media var temmelig jevnt moderat positiv i alle prøver hvori media var intakt, og glatt muskel i adventitielle vev var på tilsvarende måte positive.

I tilfeller med alvorlig aterosklerose var mye av endotelet som bekledde tunica intima enten fjernet eller det gjenværende endotel ga svak til middels positiv farging. Det plakkforbundne inflammatoriske infiltrat viste svært kraftig positiv farging i makrofager og lymfocytter, innbefattet i områder med neovascularisering. Forsterket farging ble også observert i makrofager og lymfocytter i nabostilling til eller omliggende forkalkninger og kolesterol og i områder med trombedannelse. Endotelet som bekledde nye kar, var kraftig positiv i disse områdene. Forsterket signalintensitet ble igjen observert i histiocyttiske og profilerende former, sammenliknet med fibroblastiske former av glatte muskelceller. I disse tilfellene ga inflammatoriske celler, for eksempel en undergruppe av lymfocytter, plasmaceller og makrofager i adventitia, også kraftig positiv farging.

I områder med alvorlig aterosklerose i sent stadium med minimal inflammasjon og hvilende plakk, var det mye mindre farging. I disse prøvene ble endotelet mindre intenst positivt farget, selv om gjenværende lymfocytter og makrofager som lå rundt forkalket materiale viset positiv farging.

Biologisk materiale som er anvendbart

- En deponering av human NFκB-induserende faktor 7a (NFIF-7a) klonet fra et cDNA-bibliotek fra humane, vaskulære, glatte muskelceller, subklonet i en pCR2.1-plasmidvektor, og en deponering av humant NFκB-induserende faktor 14b (NFIF-14b), klonet fra et cDNA-bibliotek fra humane, vaskulære, glatte muskelceller, subklonet i en pCR2.1-plasmidvektor, vil bli utført hos American Type Culture Collection. Tilgang på disse kulturene vil være mulig under behandlingen av patentsøknaden for en som av kommisjonæren fastslås å ha rett til dette under 35 U.S.C. §122 og 37 C.F.R. §1.14

P a t e n t k r a v

1.

Nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for NFIF
5 (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid som omfatter en
aminosyresekvens som vist SEKV. ID. NR. 1.

2.

Nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for
10 NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a polypetid som omfatter en
aminosyresekvens som er vist i SEKV. ID. NR. 2.

3.

Nukleinsyre ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte
15 DNA er et cDNA.

4.

Nukleinsyre ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte
DNA er et cDNA.

20

5.

Isolert og renset NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det induserer NFκB og omfatter en
aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 1.

25

6.

Isolert og renset NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor)-7a polypeptid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det induserer NFκB og omfatter en
aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 2.

30

7.

Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
en nukleinsyre i følge krav 1 operativt koplet til en kontroll sekvens

35

8.

Ekspresjonsvektor ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d

at den er utvalgt fra gruppen bestående av retrovialevektorer, adenoviralevektorer, adenoassosierte viralevektorer, herpesviralevektorer og nakne DNA-vektorer.

9.

- 5 Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyre i følge krav 2 operativt koplet til en kontroll sekvens

10.

- 10 Ekspresjonsvektor ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er utvalgt fra gruppen bestående av retrovialevektorer, adenoviralevektorer, adenoassosierte viralevektorer, herpesviralevektorer og nakne DNA-vektorer.

11.

- 15 Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b polypeptid, hvori nevnte polypeptid induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 1 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

12.

- 20 Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-7apolypeptid, hvori nevnte polypeptid induserer NFκB og omfatter en aminosyresekvens som vist i SEKV. ID. NR. 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

25 13.

Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en antisense nukleinsyre komplementær til en nukleinsyre som koder en NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF- 7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2.

30

14.

- 35 Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et nøytraliserende antistoff som binder til NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF-7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2 og nedsetter dens aktivitet.

15.

Sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et ribozym som kutter RNA som koder for NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor)-14b- og/eller NFIF-7a polypeptid, valgt fra gruppen bestående av SEKV. ID. NR. 1 og 2.

16.

Fremgangsmåte for å evaluere om en testforbindelse er effektiv i å forhindre aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -14b basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

(A) Sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, (2) det nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og (3) nevnte test forbindelse med nivået av NFκB-regulerte rapportørgen ekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen og

(B) fastslå hvorvidt ekspresjonen av rapportørgenet er lavere i den nevnte første prøve relativt til den nevnte andre prøve.

17.

Fremgangsmåte for evaluering av hvorvidt en testforbindelse effektivt inhiberer aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a basert på ekspresjonen av et NFκB-regulert rapportørgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

(A) Sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR.2 (2) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgen ekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2 og (5), det nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og

(B) fastslå hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er lavere i den første prøven relativt til den andre prøven.

18.

Fremgangsmåte for å fastslå hvorvidt en analyseforbindelse kan forsterke aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -14b basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
5 omfatter:

(A) sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1 (2) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen, og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgenekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 1, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og
10

(B) fastslå om hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er høyere i den nevnte første prøven relativt til den andre nevnte prøven.
15

19.

Fremgangsmåte for å identifisere forbindelser som forsterker aktiviteten av NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) -7a basert på ekspresjon av et NFκB-regulert rapportørgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:
20

(A) sammenlikning av nivået av NFκB-regulert genekspresjon i en første prøve som omfatter: (1) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2 og (2) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen, og (3) nevnte testforbindelse, med nivået av NFκB-regulerte rapportørgenekspresjon i en andre prøve som omfatter (4) en aminosyresekvens som omfatter SEKV. ID. NR. 2, og (5) nevnte NFκB-regulerte rapportørgen; og
25

(B) fastslå av hvorvidt ekspresjonen av nevnte NFκB-regulerte rapportørgen er høyere i den nevnte første prøven enn i den nevnte andre prøven.
30

20.

Anvendelse av et isolert NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebygging av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.
35

21.

Anvendelse av en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en
5 NFκB-regulert inflammatorisk respons.

22.

Anvendelse av en rekombinant vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF (Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en
10 aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

23.

Anvendelse av en defekt, rekombinant viral vektor som omfatter en nukleinsyre som
15 koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 1 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

24.

20 Anvendelse av et isolert NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

25

25. Anvendelse av en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

30

26.

Anvendelse av en rekombinant vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet
35 på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

27.

Anvendelse av en defekt rekombinant viral vektor som omfatter en nukleinsyre som koder for et NFIF(Nukleær Faktor Induserende Faktor) polypeptid som omfatter en aminosyresekvens ifølge SEKV. ID. NR. 2 for fremstilling av et medikament beregnet
5 på behandling og/eller forebyggelse av en NFκB-regulert inflammatorisk respons.

28.

Dyrket celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter vektoren i følge krav 8 eller 10.
10

29.

Dyrket celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transfektert med vektoren i følge krav 8 eller 10, hvor cellen uttrykker nevnte polypeptid som omfatter en aminosyresekvens i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2.
15

30.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en isolert ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2
20 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

31.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en rekombinant vektor som omfatter en
25 ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

32.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en terapeutisk effektiv mengde av en defekt rekombinant vektor som omfatter en ekspresserbar nukleinsyresekvens som koder for aminosyresekvensen i
30 følge SEKV. ID. NR. 1 eller 2 og en farmasøytisk akseptabel bærer.

SEQUENCE LISTING

<110> Kaplow, June
 Haws, Thomas
 Rosier, Marie
 Deneffe, Patrice

<120> NUCLEAR FACTOR KB INDUCING FACTOR

<130> 23461 usa

<140> As yet unassigned

<141> 2000-03-31

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Val Arg Ala Leu Val Cys Cys Leu Leu Thr Ala Trp His ..
 1 5 10 15

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

Pro Pro Pro Ala Ile Gly Gln Phe Trp His Val Thr Asp Leu His Leu
 35 40 45

Asp Pro Thr Tyr His Ile Thr Asp Asp His Thr Lys Val Cys Ala Ser
 50 55 60

Ser Lys Gly Ala Asn Ala Ser Asn Pro Gly Pro Phe Gly Asp Val Leu
 65 70 75 80

Cys Asp Ser Pro Tyr Gln Leu Ile Leu Ser Ala Phe Asp Phe Ile Lys
 85 90 95

Asn Ser Gly Gln Glu Ala Ser Phe Met Ile Trp Thr Gly Asp Ser Pro
 100 105 110

Pro His Val Pro Val Pro Glu Leu Ser Thr Asp Thr Val Ile Asn Val
 115 120 125

Ile Thr Asn Met Thr Thr Thr Ile Gln Ser Leu Phe Pro Asn Leu Gln
 130 135 140

Val Phe Pro Ala Leu Gly Asn His Asp Tyr Trp Pro Gln Asp Gln Leu
 145 150 155 160

Ser Val Val Thr Ser Lys Val Tyr Asn Ala Val Ala Asn Leu Trp Lys
 165 170 175

Pro Trp Leu Asp Glu Glu Ala Ile Ser Thr Leu Arg Lys Gly Gly Phe
 180 185 190

Tyr Ser Gln Lys Val Thr Thr Asn Pro Asn Leu Arg Ile Ile Ser Leu
 195 200 205

Asn Thr Asn Leu Tyr Tyr Gly Pro Asn Ile Met Thr Leu Asn Lys Thr
 210 215 220

Asp Pro Ala Asn Gln Phe Glu Trp Leu Glu Ser Thr Leu Asn Asn Ser
 225 230 235 240

Gln Gln Asn Lys Glu Lys Val Tyr Ile Ile Ala His Val Pro Val Gly
 245 250 255

Tyr Leu Pro Ser Ser Gln Asn Ile Thr Ala Met Arg Glu Tyr Tyr Asn
 260 265 270

Glu Lys Leu Ile Asp Ile Phe Gln Lys Tyr Ser Asp Val Ile Ala Gly
 275 280 285

Gln Phe Tyr Gly His Thr His Arg Asp Ser Ile Met Val Leu Ser Asp
 290 295 300

Lys Lys Gly Ser Pro Val Asn Ser Leu Phe Val Ala Pro Ala Val Thr
 305 310 315 320

Pro Val Lys Ser Val Leu Glu Lys Gln Thr Asn Asn Pro Gly Ile Arg
 325 330 335

Leu Phe Gln Tyr Asp Pro Arg Asp Tyr Lys Leu Leu Asp Met Leu Gln
 340 345 350

Tyr Tyr Leu Asn Leu Thr Glu Ala Asn Leu Lys Gly Glu Ser Ile Trp
 355 360 365

Lys Leu Glu Tyr Ile Leu Thr Gln Thr Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gln
 370 375 380

Pro Glu Ser Leu Tyr Gly Leu Ala Lys Gln Phe Thr Ile Leu Asp Ser
385 390 395 400

Lys Gln Phe Ile Lys Tyr Tyr Asn Tyr Phe Phe Val Ser Tyr Asp Ser
405 410 415

Ser Val Thr Cys Asp Lys Thr Cys Lys Ala Phe Gln Ile Cys Ala Ile
420 425 430

Met Asn Leu Asp Asn Ile Ser Tyr Ala Asp Cys Leu Lys Gln Leu Tyr
435 440 445

Ile Lys His Asn Tyr
450

<210> 2

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Leu Val Arg Ala Leu Val Cys Cys Leu Leu Thr Ala Trp His
1 5 10 15

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

Pro Pro Pro Ala Ile Gly Gln Phe Trp His Val Thr Asp Leu His Leu
35 40 45

Asp Pro Thr Tyr His Ile Thr Asp Asp His Thr Lys Val Cys Ala Ser
50 55 60

Ser Lys Gly Ala Asn Ala Ser Asn Pro Gly Pro Phe Gly Asp Val Leu
65 70 75 80

Cys Asp Ser Pro Tyr Gln Leu Ile Leu Ser Ala Phe Asp Phe Ile Lys
85 90 95

Asn Ser Gly Gln Glu Ala Ser Phe Met Ile Trp Thr Gly Asp Ser Pro
100 105 110

Pro His Val Pro Val Pro Glu Leu Ser Thr Asp Thr Val Ile Asn Val
115 120 125

Ile Thr Asn Met Thr Thr Thr Ile Gln Ser Leu Phe Pro Asn Leu Gln
130 135 140

Val Phe Pro Ala Leu Gly Asn His Asp Tyr Trp Pro Gln Val Tyr Ile
145 150 155 160

Ile Ala His Val Pro Val Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Gln Asn Ile Thr
165 170 175

Ala Met Arg Glu Tyr Tyr Asn Glu Lys Leu Ile Asp Ile Phe Gln Lys
180 185 190

Tyr Ser Asp Val Ile Ala Gly Gln Phe Tyr Gly His Thr His Arg Asp
195 200 205

Ser Ile Met Val Leu Ser Asp Lys Lys Gly Ser Pro Val Asn Ser Leu
210 215 220

Phe Val Ala Pro Ala Val Thr Pro Val Lys Ser Val Leu Glu Lys Gln
225 230 235 240

Thr Asn Asn Pro Gly Ile Arg Leu Phe Gln Tyr Asp Pro Arg Asp Tyr
245 250 255

Lys Leu Leu Asp Met Leu Gln Tyr Tyr Leu Asn Leu Thr Glu Ala Asn
260 265 270

Leu Lys Gly Glu Ser Ile Trp Lys Leu Glu Tyr Ile Leu Thr Gln Thr
275 280 285

Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Leu Tyr Gly Leu Ala Lys
290 295 300

Gln Phe Thr Ile Leu Asp Ser Lys Gln Phe Ile Lys Tyr Tyr Asn Tyr
305 310 315 320

Phe Phe Val Ser Tyr Asp Ser Ser Val Thr Cys Asp Lys Thr Cys Lys
325 330 335

Ala Phe Gln Ile Cys Ala Ile Met Asn Leu Asp Asn Ile Ser Tyr Ala
340 345 350

Asp Cys Leu Lys Gln Leu Tyr Ile Lys His Asn Tyr
355 360

<210> 3

<211> 1362

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggcgctgg tgcgcgcact cgtctgctgc ctgctgactg cctggcactg ccgctccggc 60
ctcgggctgc ccgtggcgcc cgcaggcggc aggaatcctc ctccggcgat aggacagttt 120
tggcatgtga ctgacttaca cttagaccct acttaccaca tcacagatga ccacacaaaa 180
gtgtgtgctt catctaaagg tgcaaatgcc tccaaccctg gcccttttgg agatgttctg 240
tgtgattctc catatcaact tattttgtca gcatttgatt ttattaaaaa ttctggacaa 300
gaagcatctt tcatgatatg gacaggggat agcccacctc atgttcctgt acctgaactc 360
tcaacagaca ctgttataaa tgtgatcact aatatgacaa ccaccatcca gagtctcttt 420
ccaaatctcc aggttttccc tgcgctgggt aatcatgact attggccaca ggatcaactg 480
tctgtagtca ccagtaaagt gtacaatgca gtagcaaac tctggaaacc atggctagat 540
gaagaagcta ttagtacttt aaggaaaggt ggtttttatt cacagaaagt tacaactaat 600
ccaaacctta ggatcatcag tctaaacaca aacttgtagt acggcccaaa tataatgaca 660
ctgaacaaga ctgaccacgc caaccagttt gaatggctag aaagtacatt gaacaactct 720
cagcagaata aggagaaggt gtatatcata gcacatgttc cagtggggtg tctgccatct 780
tcacagaaca tcacagcaat gagagaatac tataatgaga aattgataga tatttttcaa 840
aaatacagtg atgtcattgc aggacaattt tatggacaca ctcacagaga cagcattatg 900
gttctttcag ataaaaaagg aagtccagta aattctttgt ttgtggctcc tgctgttaca 960
ccagtgaaga gtgtttttaga aaaaagagac aacaatcctg gtatcagact gtttcagtat 1020
gatcctcgtg attataaatt attggatatg ttgcagtatt acttgaatct gacagaggcg 1080
aatctaaagg gagagtcctt ctggaagctg gagtatatcc tgaccacagc ctacgacatt 1140
gaagatttgc agccggaaaag tttatatgga ttagctaaac aatttacaat cctagacagt 1200
aagcagttta taaaatacta caattacttc tttgtgagtt atgacagcag tgtaacatgt 1260
gataagacat gtaaggcctt tcagatttgt gcaattatga atcttgataa tatttcctat 1320
gcagattgcc tcaaacagct ttatataaag cacaattact ag 1362

```

<210> 4

<211> 1095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

atggcgctgg tgcgcgcact cgtctgctgc ctgctgactg cctggcactg ccgctccggc 60
ctcgggctgc ccgtggcgcc cgcaggcggc aggaatcctc ctccggcgat aggacagttt 120
tggcatgtga ctgacttaca cttagaccct acttaccaca tcacagatga ccacacaaaa 180
gtgtgtgctt catctaaagg tgcaaatgcc tccaaccctg gcccttttgg agatgttctg 240
tgtgattctc catatcaact tattttgtca gcatttgatt ttattaaaaa ttctggacaa 300
gaagcatctt tcatgatatg gacaggggat agcccacctc atgttcctgt acctgaactc 360
tcaacagaca ctgttataaa tgtgatcact aatatgacaa ccaccatcca gagtctcttt 420
ccaaatctcc aggttttccc tgcgctgggt aatcatgact attggccaca ggtgtatatc 480
atagcacatg ttccagtggt gtatctgccg tcttcacaga acatcacagc aatgagagaa 540
tactataatg agaaattgat agatattttt caaaagtaca gtgatgtcat tgcaggacaa 600
ttttatggac aactcacag agacagcatt atggttcttt cagataaaaa aggaagtcca 660
gtaaattctt tgtttgtggc tcctgctgtt acaccagtga agagtgtttt agaaaaacag 720
accaacaatc ctggtatcag actgtttcag tatgatcctc gtgattataa attattggat 780
atgttgcagt attacttgaa tctgacagag gcgaatctaa agggagagtc catctggaag 840
ctggagtata tcctgaccca gacctacgac attgaagatt tgcagccgga aagtttatat 900
ggattagcta aacaatttac aatcctagac agtaagcagt ttataaaata ctacaattac 960

```

ttctttgtga gttatgacag cagtgtaca tgtgataaga catgtaaggc ctttcagatt 1020
 .tgtgcaatta tgaatcttga taatatttcc tatgcagatt gcctcaaaca gctttatata 1080
 aagcacaatt actag 1095

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Lys Gly Ala Asn Ala Ser Asn Pro Gly Pro Phe Gly Asp Val
 1 5 10 15

1/9

Plasmid: NFIF14B
 Aminosyrer: 453

MALVRALVCCLLTAWHCRSG	20
LGLPVAPAGGRNPPPAIGQF	40
WHVTDLHLDPTYHITDDHTK	60
VCASSKGANASNPGPFQDVL	80
CDSPLYQLILSAFDIFKNSGQ	100
EASEMIWTGDSPPHVPVPEL	120
STDVINVITNMTTTIQSLF	140
PNLQVFPALGNHDYWPQDQL	160
SVVTSKVYNAVANLWKPWLD	180
EEAISTLRKGGFYSQKVTN	200
PNLRISLNTNLYYGNIMT	220
LNKTDPANQFEWLESTLNS	240
QONKEKVYIIAHVPVGYLPS	260
SONITAMREYYNEKLIDIFQ	280
KYSDVIAGQFYGHTRDSIM	300
VLSDKKGSPVNSLFVAPAVT	320
PVKSVLEKQTNNPGIRLFQY	340
DPRDYKLLDMLQYYLNLTEA	360
NLKGESIWKLEYILTQTYDI	380
EDLPESLYGLAKQFTILDS	400
KQFIKYNYFFVSYDSSVTC	420
DKTCKAFQICAIMNLDNISY	440
ADCLKQLYIKHNY	460

FIGUR 1

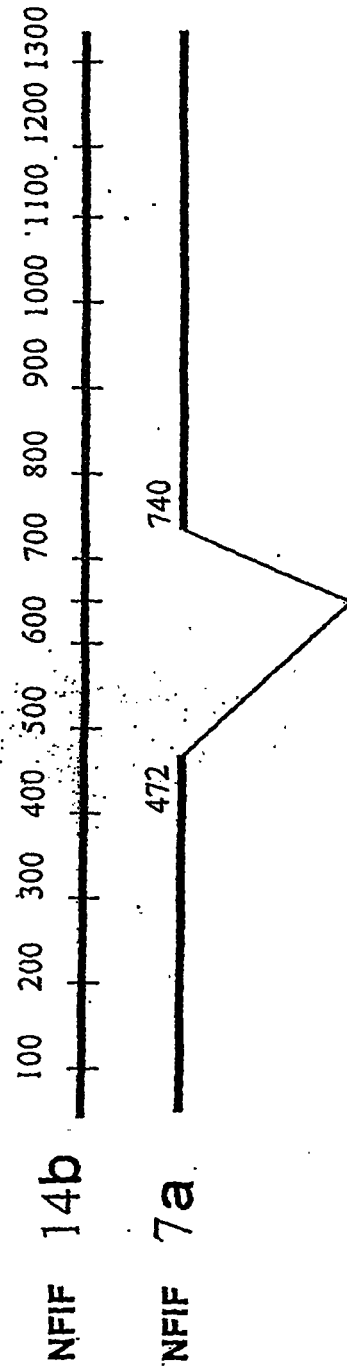
2/9

Plasmid: NF1F7A
 Aminosyrer: 364

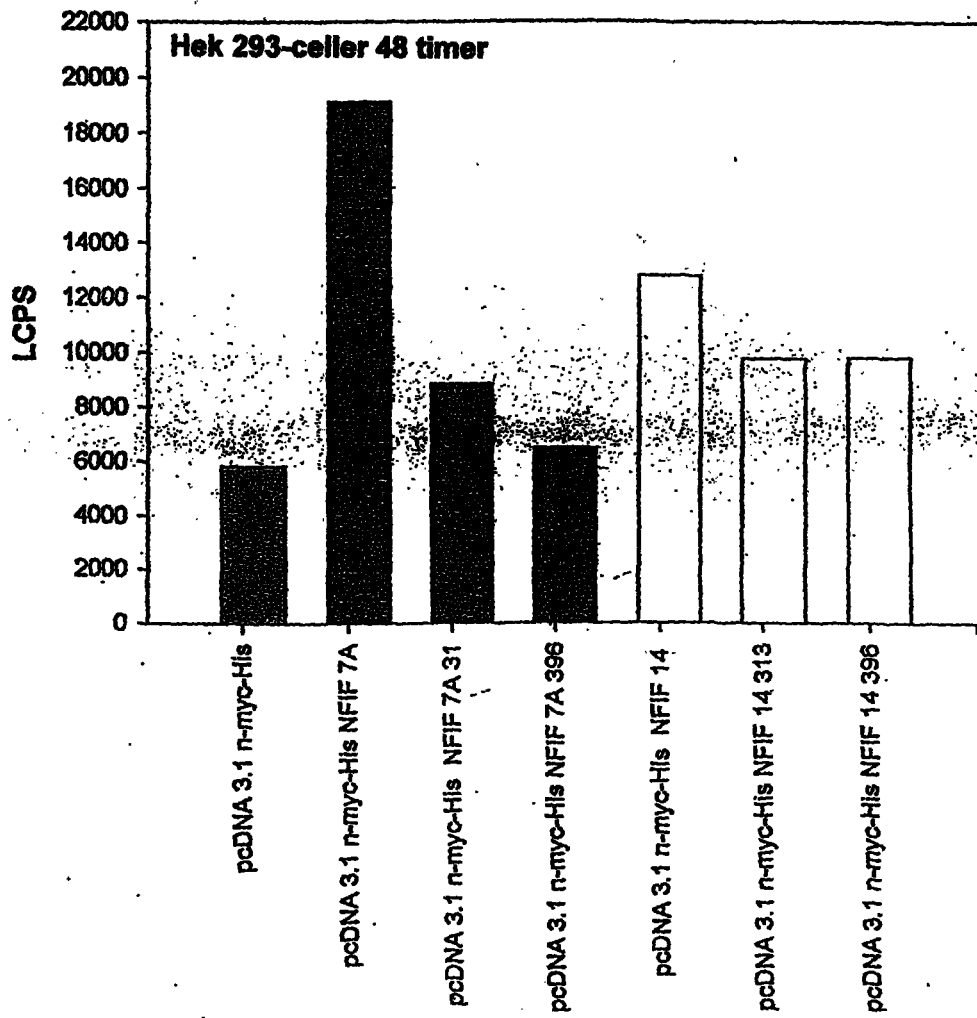
MALVRALVCCLLTAWHCRSG	20
LGLPVAPAGGRNPPPAIGQF	40
WHVTDLHLDPTYHITDDHTK	60
VCASSKGANASNPGPFQDVL	80
CDSFYQLILSAFDFIKNSGQ	100
EASEMIWTGDSPPHVPVPEL	120
STDTVINVITNMTTIIQSLF	140
PNLQVFPALGNHDYWPQVYI	160
IAHVPVGYLPSSQNTAMRE	180
YYNEKLIDIFQKYSQVIAGQ	200
FYGHTRDSIMVLSKKGSP	220
VNSLFVAPAVTPVKSYLEKO	240
TNNPGIRLFQYDPRDYKLLD	260
MLQYYLNLTEANLKGESIWK	280
LEYILTQTYDIEDLPESLY	300
GLAKQFTILDSKQFIKYYNY	320
FFVSYDSSVTCDKTCKAFQI	340
CAIMNLDNISYADCLKQLYI	360
KHNY	380

FIGUR 2.

951 TGCTGTTACACCAAGTGAAGAGTGTGTTTAAAGAAAACAGACCAACAATCCTG NFIF14B
 684 TGCTGTTACACCAAGTGAAGAGTGTGTTTAAAGAAAACAGACCAACAATCCTG NFIF7A
 1001 GTATCAGACTGTTTCAGTATGATCCTCGTGATTATAAATTATTGGATATG NFIF14B
 734 GTATCAGACTGTTTCAGTATGATCCTCGTGATTATAAATTATTGGATATG NFIF7A
 1051 TTGCAGTATTACTTGAATCTGACAGAGGCGAATCTAAAGGGCAGACTCCAT NFIF14B
 784 TTGCAGTATTACTTGAATCTGACAGAGGCGAATCTAAAGGGCAGACTCCAT NFIF7A
 1101 CTGGAAGCTGGAGTATATCCTGACCCAGACCTACGACATTGAAGATTTC NFIF14B
 834 CTGGAAGCTGGAGTATATCCTGACCCAGACCTACGACATTGAAGATTTC NFIF7A
 1151 AGCCGGGAAAAGTTTATATGGATTAGCTAAACAATTTACAATCCTAGACAGT NFIF14B
 884 AGCCGGGAAAAGTTTATATGGATTAGCTAAACAATTTACAATCCTAGACAGT NFIF7A
 1201 AAGCAGTTTATAAAAATACTACAATTACTTCTTTGTGAGTTATGACAGCAG NFIF14B
 934 AAGCAGTTTATAAAAATACTACAATTACTTCTTTGTGAGTTATGACAGCAG NFIF7A
 1251 TGTAACATGTGATAAGACATGTAAGGCCCTTTCAGATTGTTGCAATTATGA NFIF14B
 984 TGTAACATGTGATAAGACATGTAAGGCCCTTTCAGATTGTTGCAATTATGA NFIF7A
 1301 ATCTTGATAAATATTTTCTATGCAAGATGCGCTCAAAACAGCTTTATATAAAG NFIF14B
 1034 ATCTTGATAAATATTTTCTATGCAAGATGCGCTCAAAACAGCTTTATATAAAG NFIF7A
 1351 CACAATTACTAG NFIF14B
 1084 CACAATTACTAG NFIF7A

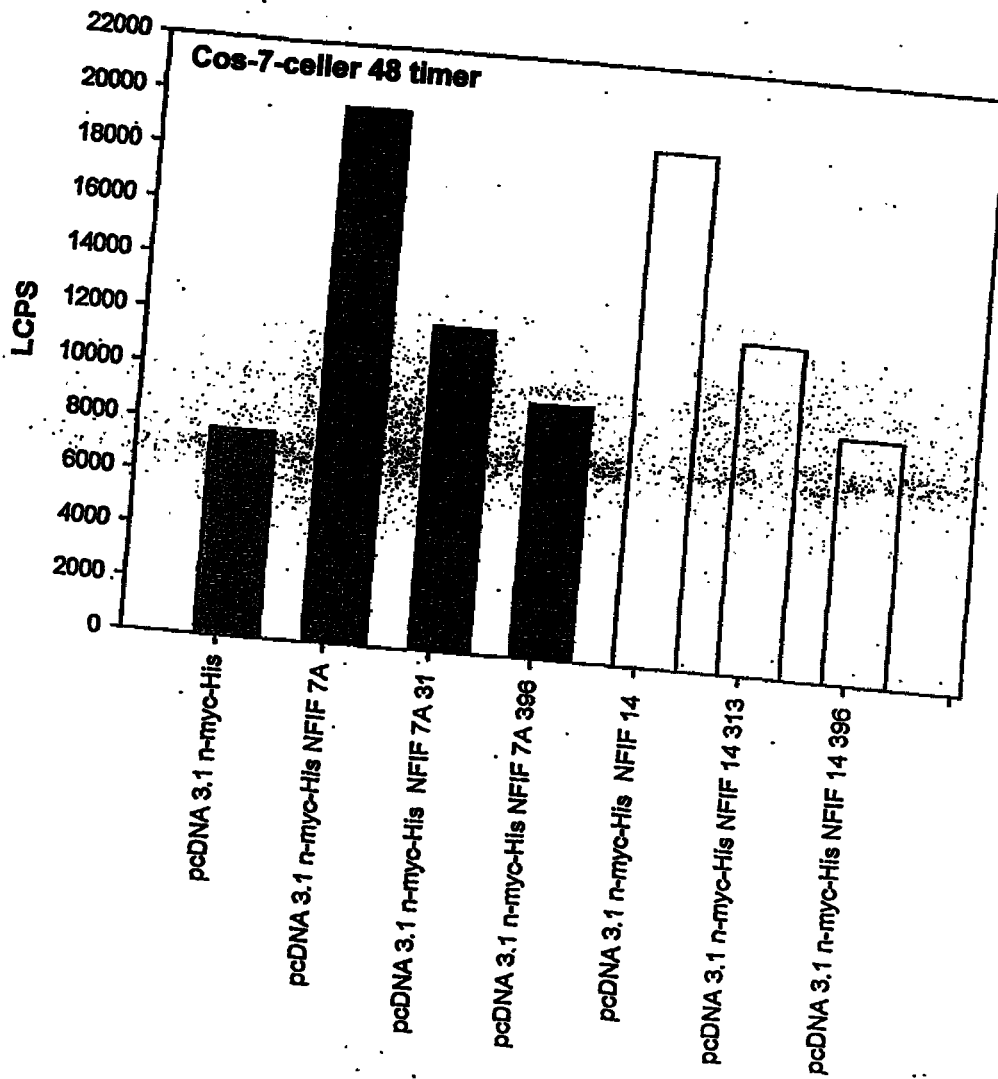


FIGUR 4

NF κ B-rapportør med NFIF

FIGUR 5

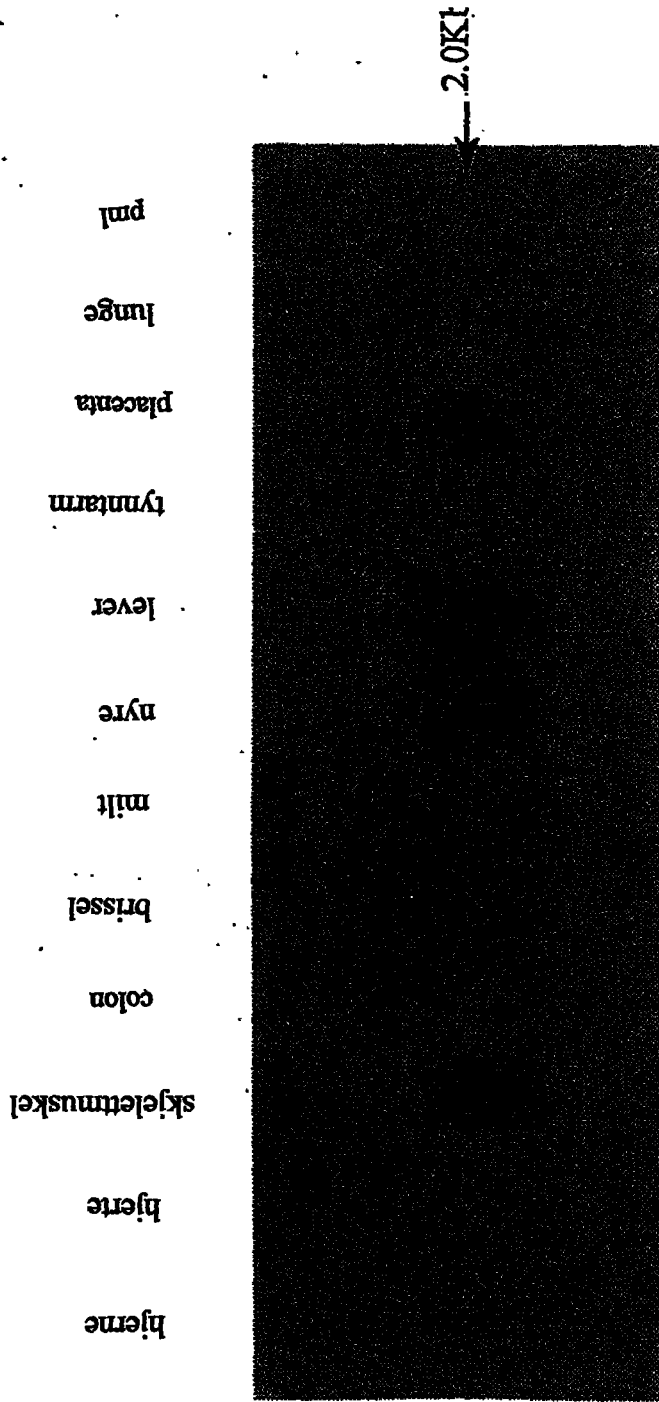
7/9

NF κ B-rapportør med NFIF

FIGUR 6

SKGANASNPFGDV

FIGUR 7



FIGUR 8