

Даний винахід загалом стосується рецепторів, що відносяться до суперродини рецепторів TNF/NGF, і контролю їх біологічних функцій. Надродина рецепторів TNF/NGF включає рецептори, такі як рецептори p55 і p75 чинників некрозу пухлин (TNF-R: тут і далі вони позначаються як p55-R і p75-R) і рецептори FAS-лігандів (також що позначаються як FAS/APO1 або FAS-R: тут і далі буде позначатися як FAS-R) і інші. Конкретно даний винахід стосується нових білків, які зв'язуються з іншими білками, які самі по собі зв'язуються напряду або опосередковано з членами рецепторної родини TNF/NGF і іншими внутрішньоклітинними білками-модуляторами.

Більш конкретно, винахід стосується одного такого білка, що позначається тут і далі як RAP-2 (що відповідає RIP-асоційованому білка-2), і його ізоформ, фрагментів, похідних, рівно як і білків, що зв'язуються з білком RAP-2.

Білок RAP-2 зв'язується з білком RIP («взаємодіючий з рецепторами білок») і має здатність модулювати або опосередковувати функції RIP, таким чином будучи здатним модулювати або опосередковувати, як напряду, так і не прямо, функції інших білків, які зв'язуються з RIP прямо або опосередковано. Білки, що зв'язуються з RAP-2 є модуляторами/медіаторами функцій RAP-2.

Чинник некрозу пухлин (TNF- $\alpha$ ) і лімфотоксин (TNF- $\beta$ ) (тут і далі абревіатура TNF відноситься і до TNF- $\alpha$  до TNF- $\beta$ ) є багатофункціональними протизапальними цитокінами, в основному моноклеарними фагоцитами, що виробляються, які характеризуються багатостороннім впливом на клітини [D.Wallach, 1986, In «Interferon 7», ed. I. Gresser, Acad. Press, London, pp.83-122; Beutler & Cerami, 1987]. І TNF- $\alpha$ , і TNF- $\beta$  виявляють свою активність шляхом зв'язування на специфічних поверхово-клітинних рецепторах. Деякі з їх ефектів, мабуть, є цінними для організму: наприклад, вони можуть руйнувати пухлинні клітини або інфіковані вірусом клітини і сприяти протибактеріальній активності гранулоцитів. У цьому значенні TNF бере участь в захисті організму проти пухлин і інфекційних агентів, а також грає роль у відновленні після пошкоджень. Отже, TNF може бути використаний як протипухлинний агент, при застосуванні якого він зв'язується зі своїми рецепторами на поверхні пухлинних клітин, таким чином ініціюючи процеси, що призводять до загибелі цих пухлинних клітин. Також TNF може бути використаний як проти інфекційний агент.

Однак, крім того і TNF- $\alpha$ , і TNF- $\beta$  виявляють і негативні ефекти. Є підтвердження того, що надмірне вироблення TNF-а може грати істотну патогенну роль в патогенезі деяких захворювань. Наприклад, відомо, що вплив TNF- $\alpha$ , насамперед, на судинну систему організму є основною причиною симптомів септичного шоку (Tracey et al., 1986). При деяких захворюваннях TNF може зумовлювати надмірне зниження маси тіла (кахексію) внаслідок придушення активності адипоцитів і внаслідок зумовлення анорексії, через що TNF- $\alpha$  також називають кахектином. Також він був описаний як медіатор пошкодження тканин при ревматоїдних захворюваннях (Beutler & Cerami, 1987) і як основний медіатор пошкоджень, що виявляються при реакції «трансплантат проти господаря» (Piquet et al., 1987). Крім того, TNF відомий як учасник запальних процесів і багатьох інших захворювань.

Два диференційованих і незалежно один від одного експресованих рецептори - p55 і p75 TNF-R, причому обидва зв'язуються з TNF- $\alpha$  і TNF- $\beta$ , - ініціюють і (або) опосередковують згадувану вище біологічну активність TNF. Ці два рецептори характеризуються наявністю структурно різних внутрішньоклітинних доменів, що підтверджує диференціювання обслуговуючих їх сигнальних систем [див. Hohmann et al., 1989, Engelmann et al., 1990; Brockhaus et al., 1990; Leotscher et al., 1990; Schall et al., 1990; Nophar et al., 1990; Smith et al., 1990; Heller et al., 1990]. Однак, клітинні механізми, наприклад, різні білки і можливі інші чинники, які залучені у внутрішньоклітинну передачу сигналів TNF-рецепторам p55 і p75, доки не встановлені. Це той внутрішньоклітинний сигнальний механізм, який має місце звичайно після зв'язування ліганду, тобто TNF ( $\alpha$  і  $\beta$ ), на його рецепторі, який відповідає за включення каскаду реакцій, що неминуче призводить до реакції, що виявляється, клітини на даний TNF.

Що стосується згадуваної вище цитотоксичної дії TNF, то в більшості досліджених до теперішнього часу клітин такий ефект в основному опосередковується рецептором TNF-R p55. Антитіла, специфічні відносно позаклітинного домену (тобто ліганд-зв'язуючого домену) рецептора TNF-R p55, самі можуть опосередковувати цитотоксичний ефект [див. європейську патентну заявку 412486], що корелує з ефективністю перехресного зшиття цих рецепторів антитілами, що, як вважається, є першим етапом в формуванні внутрішньоклітинного сигнального каскаду. Далі, мутаційний аналіз (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993) показав, що біологічні функції TNF-R p55 залежать від цілісності його внутрішньоклітинного домену. Відповідно, було підтверджено, що ініціація внутрішньоклітинного сигналу веде до цитотоксичного вияву рецептора TNF-R p55. Більш того TNF ( $\alpha$  і  $\beta$ ) зустрічається у вигляді гомотримеру, а раз так, то було підтверджено, що він індукує внутрішньоклітинні сигнали через TNF-R p55 за рахунок його здатності зв'язуватися молекулами рецепторів і утворювати з ними перехресну зшивку, тобто призводити до агрегації цих рецепторів.

Іншим представником надродини рецепторів TNF/NGF є FAS-рецептор (FAS-R), який також називають FAS-антигеном, що є поверхово-клітинним білком, експресованим в різних тканинах і що характеризується гомологією, з рядом поверхово-клітинних рецепторів, включаючи TNF-R і NGF-R. Рецептор FAS-R опосередковує загибель клітин в процесі апоптозу (Itoh et al., 1991) і, мабуть, є негативним селективним чинником аутореактивних Т-лімфоцитів: тобто в процесі дозрівання Т-лімфоцитів FAS-R опосередковує апоптотичну загибель Т-клітин, що розпізнають власні антигени. Також було встановлено, що мутації в гені FAS-R (мутації lpr) зумовлюють лімфопроліферативні синдроми у мишей, які схожі із системною червоною лихоманкою, що є аутоімунним захворюванням людини (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Лігандом рецептору FAS-R, мабуть, є молекула, що асоціюється з клітинними поверхнями, що знаходиться, крім інших клітин, на Т-кілерах (або цитотоксичних Т-лімфоцитах - CTL): отже, коли такі клітини CTL контактують з клітинами, несучими FAS-R, вони виявляються здатними індукувати апоптотичну загибель клітин, несучих рецептор FAS-R. Крім того, були сформовані моноклональні антитіла, які специфічні по відношенню до FAS-R, при тому, що такі моноклональні антитіла здатні індукувати загибель клітин, несучих FAS-R, за механізмом апоптозу, включаючи мишачі клітини, трансформовані кДНК, що включає ген FAS-R людини (Itohetal, 1991).

Заявниками було зроблено ряд спроб [див., наприклад, європейські патентні заявки №№186833, 308378, 398327 і 412486] проконтролювати небажані ефекти TNF за рахунок придушення зв'язування TNF з їх рецепторами, використовуючи для цієї мети антитіла до TNF або цитоплазматичні рецептори TNF з метою забезпечення конкуренції по скріпленню TNF з поверхнево-клітинними рецепторами TNF-R. Крім того, з урахуванням того, що зв'язування TNF з їх рецепторами є необхідним для вияву TNF-індукованих клітинних ефектів, заявники намагалися [див., наприклад, європейську патентну заявку 568925] забезпечити модуляцію впливу TNF шляхом зміни активності рецепторів TNF-R.

Коротко, [заявка EP 568925] стосується способу модулювання передачі сигналу і (або) відщеплення від TNF-R таким чином, щоб пептиди або інші молекули могли взаємодіяти з рецептором або самі, або опосередковано через ефекторні пептиди, взаємодіючи з цим рецептором, що таким чином повинно модулювати нормальні функції TNF-R. У [заявці EP 568925] описується конструкція і дана характеристика різних мутантних рецепторів TNF-R p55, несучих мутації у позаклітинних, трансмембранних і внутрішньоклітинних доменах TNF-R p55. У цьому випадку в згаданих вище доменах були ідентифіковані сегменти, які є ключовими в забезпеченні функцій рецептору TNF-R p55, тобто функцій зв'язування з лігандом і подальшої передачі сигналу і включення внутрішньоклітинного сигнального шляху, що забезпечує зрештою ефекти дії TNF на дані клітини, що спостерігаються. Крім того, також описується ряд підходів до виділення і ідентифікації білків, пептидів або інших чинників, які здатні зв'язуватися з різними дільницями згаданих вище доменів TNF-R, при тому, що ці білки, пептиди і інші чинники можуть брати участь в регуляції або модулюванні активності TNF-R. Також [в заявці EP 568925] включений ряд підходів до виділення і клонування послідовностей ДНК, що кодують такі білки і пептиди; до конструювання експресуючих векторів, необхідних для вироблення даних білків і пептидів; і до формування антитіл або їх фрагментів, які б взаємодіяли з TNF-R або із згаданими вище білками і пептидами, які зв'язуються з різними дільницями TNF-R. Однак, [в заявці EP 568925] не конкретизуються реальні білки і пептиди, які б зв'язувалися з внутрішньоклітинними доменами рецептору TNF-R (наприклад TNF-R p55), а також не описаний «двохгібридний підхід» до виділення і ідентифікації таких білків або пептидів, які зв'язуються з внутрішньоклітинними доменами TNF-R. Також [в заявці EP 56892] не представлені білки або пептиди, здатні зв'язуватися з внутрішньоклітинним доменом FAS-R.

Хоч і відомо, що рецептори чинника некрозу пухлин (TNF) і структурно родинний ним рецептор FAS-R зумовлюють в клітинах шляхом стимуляції лігандів, виробляються лейкоцитами, деструктивну активність, що призводить до їх власної загибелі, проте механізми такого опосередковування доки зрозумілі не до кінця. Мутаційний аналіз показує, що сигнальні шляхи рецепторів FAS-R і TNF-R p55, спрямованого на цитотоксичність, залучають різні дільниці їх внутрішньоклітинних доменів (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh & Nagata, 1993). Ці дільниці (т.з. «згубні домени») характеризуються схожістю амінокислотних послідовностей. Є тенденція до самоасоційованості «згубних доменів» у FAS-R і p55-R. Така самоасоційованість, мабуть, зумовлює агрегацію рецепторів, що є необхідною для ініціація сигнального шляху [див. Song et al., 1994; Wallach et al., 1994; Boldin et al., 1995], а при інтенсивній експресії цих рецепторів вона може призводити до зумовлення, не залежних від лігандів сигналів [Boldin et al., 1995].

Як і при інших ефектах, що зумовлюються рецепторами, індукція клітинної загибелі рецепторами TNF і FAS-R забезпечується рядом міжбілкових взаємодій, що тягнуться від зв'язування ліганду на рецепторі до заключної активації каталітичних ефекторних функцій, які у випадку, що аналізується визначають некаталітичні міжбілкові взаємодії, які ініціюють сигнал загибелі клітин: зв'язування гримувальних молекул TNF або ліганду FAS-R з відповідними рецепторами, подальші взаємодії з іншими внутрішньоклітинними доменами (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh & Nagata, 1993), що визначаються здатністю послідовностей «доменів загибелі» до самоасоціювання (Boldin et al., 1995a), і індукції зв'язування двох цитоплазматичних білків (які також можуть зв'язуватися один з одним) з внутрішньоклітинними доменами цих рецепторів - білка MORT-1 (або FADD) з FAS-R (Boldin et al., 1995b; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995) і білка TRADD з p55-R (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996). Три білки, які зв'язуються з внутрішньоклітинним доменом FAS-R і p55-R по їх дільниці «згубного домену», залучені в індукцію загибелі клітин під впливом цих рецепторів внаслідок гетерологічної асоціації гомологічних дільниць, і які також здатні опосередковувати клітинну загибель, були ідентифіковані в процедурі скрінгу, званої «подвійною гібридизацією дріжджів». Один з цих білків - MORT-1 (Boldin et al., 1995b) - також відомий як білок FADD (Chinnaiyan et al., 1995), який специфічно зв'язується з рецептором FAS-R. Інший білок - TRADD (див. також Hsu et al., 1995, 1996) - зв'язується з рецептором p55-R, третій білок - RIP (див. також Stanger et al., 1995) - зв'язується і з FAS-R, і з p55-R. Крім зв'язування з FAS-R і p55-R, ці білки також здатні зв'язуватися один з одним, що забезпечує функціональний «обмін» між FAS-R і p55-R. Таке зв'язування відбувається за консервативною дільницею послідовності - «модулю домену загибелі», - що є загальним для цих рецепторів і білків, що зв'язуються з ними. Більш того хоч в двогибридному дріжджовому тесті було показано, що білок MORT-1 зв'язується з FAS-R спонтанно, в клітинах ссавців таке зв'язування має місце тільки після стимуляції даного рецептору: це підтверджує, що MORT-1 бере участь в початковій події сигнального шляху FAS-R. Білок MORT-1 не включає будь-яких мотивів, характерних для вияву каталітичної активності: отже, його здатність опосередковувати загибель клітин, як передбачається, не заснована на власній активності MORT-1, а швидше всього пов'язана з активацією іншого(їх) білка(ів), які зв'язуються з MORT-1 і діють по наступних етапах цього сигнального каскаду. При клітинній експресії мутантного MORT-1, позбавленого N-кінцевої частини молекули, як було показано, відбувається блокування індукції цитотоксичності під дією FAS/APO1 (FAS-R) або p55-R (Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996): це вказує на те, що ця N-кінцева дільниця передає сигнали про цитотоксичний вплив обох цих рецепторів через деякі білок-білкові взаємодії.

Таким чином, мотиви «доменів загибелі» в складі рецепторів p55-R і FAS-R, рівно як і три асоційованих з ними білки MORT-1, RIP і TRADD, мабуть, є сайтами таких міжбілкових взаємодій. Три білки MORT-1, RIP і TRADD взаємодіють з внутрішньоклітинними доменами рецепторів p55-R і FAS-R за рахунок зв'язування їх «доменів загибелі» з такими ж в складі рецепторів, а «згубні домени» і RIP, і TRADD самоасоціюються (хоч в

цьому відношенні білок MORT-1 відрізняється тим, що його «згубний домен» в самоасціаціях не бере участь). Більш того білки MORT-1 і TRADD диференційовано зв'язуються з p55-R і FAS-R і також зв'язуються один з одним. Більш того і MORT-1, і TRADD ефективно зв'язуються з RIP. Отже, можна передбачити, що взаємодія між трьома білками MORT-1, RIP і TRADD є важливим компонентом загального процесу модуляції внутрішньоклітинного сигналу, що опосередковується цими білками. Порушення взаємодії між цими трьома внутрішньоклітинними білками буде зумовлювати модуляцію ефектів, що визначаються такою взаємодією. Наприклад, придушення зв'язування білка TRADD з MORT-1 може модулювати взаємодію FAS-R-p55 TNF-R. Таким же чином, придушення RIP додатково до згаданого вище придушення зв'язування TRADD з MORT-1 може додатково змінити взаємодію FAS-R-p55 TNF-R.

Моноклональні антитіла, проти «домени загибелі» p55-R, зокрема, у відношенні зв'язуючого сайту TRADD і RIP, також можуть бути використані для придушення або запобігання скріплення цих білків, таким чином зумовлюючи модуляцію взаємодії між FAS-R і p55-R.

Також недавно було встановлено, що, крім активності, що згадувалася вище, по індукції загибелі клітин і її модуляції, опосередкованих різними рецепторами і білками, що зв'язуються з ними, включаючи FAS-R, p55-R, MORT-1, TRADD, RIP, MACH, Mch4 і G1, ряд цих рецепторів і білків, що зв'язуються з ними також залучені до модуляції активності ядерного транскрипційного чинника NF-KB, який є ключовим медіатором життєздатності або виживання клітин, будучи відповідальним за контроль експресії значного числа генів, пов'язаних з імунітетом і запальними процесами. Наприклад, було встановлено, що TNF- $\alpha$  може ефективно стимулювати активацію чинника NF-KB: таким чином TNF- $\alpha$  здатний індукувати два типи сигналів в клітинах - один з них опосередковує загибель клітин, а інший захищає клітини від індукції загибелі за рахунок включення експресії генів під контролем NF-KB (див. Beg & Baltimore, 1996; Wang et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996). Схожий подвійний ефект також був описаний і для рецептору FAS-R (див. відсилання до такого ефекту в згаданій вище статті Van Antwerp et al., 1996). Отже, можна передбачити існування тонкого балансу між загибеллю клітин і виживанням клітин внаслідок стимуляції різних типів клітин дією TNF- $\alpha$  і (або) ліганду FAS-R, при тому, що кінцевий результат стимуляції залежить від того, за яким внутрішньоклітинним механізмом мала місце більш сильна стимуляція, внаслідок чого в результаті або має місце загибель клітини (звичайно за типом апоптозу), або зберігається життєздатність клітини завдяки активації чинника NF-KB.

Крім того, недавно заявниками даного винаходу було додатково встановлено вірогідний механізм, за яким члени родини рецепторів TNF/NGF активують NF-KB [див. Malinin et al., 1997 і різні бібліографічні посилання, що є в цій публікації, а також тематично пов'язані заявки на патент Ізраїлю №№ IL-117800 і IL-119133]. Коротко, було встановлено, що деякі члени родини рецепторів TNF/NGF здатні активувати NF-KB опосередковано через загальний білок-адаптер -TRAF2. Вперше встановлена протеїнкіназа, позначена як NIK [див. цитовані вище за Malinin et al., 1997 і заявки IL-117800 і IL-119133], здатна зв'язуватися з білком TRAF2 і стимулювати активність чинника NF-KB. Дійсно, було показано [див. згадувані публікації Malinin et al. і ізраїльські заявки], що експресія в клітинах дефіцитних за кіназою NIK мутантів зумовлює нездатність цих клітин зумовлювати стимуляцію NF-KB за нормальним ендогенним механізмом, а також блокування в цих клітинах індукції активності NF-KB під дією TNF через FAS-R і блокування індукції NF-KB білками TRADD, RIP і MORT-1 (які є білками-адаптерами, що зв'язуються з цими рецепторами p55-R і/або FAS-R). Всі рецептори p55-R, p75-R, FAS-R і їх адаптерні білки MORT-1, TRADD і RIP зв'язуються з білком TRAF2 напряму або опосередковано, а він, в свою чергу, завдяки здатності зв'язуватися з кіназою NIK модулює індукцію NF-KB.

Серед згадуваних вище білків-адаптерів, залучених до підтримки тонкого балансу між загибеллю клітин і виживанням клітин після стимуляції FAS-R і (або) p55-R, білок RIP, як представляється, грає найбільш важливу роль. У С-кінцевій частині білка RIP [див. Stanger et al., 1995; також Malinin et al., 1997] є ділянка, яка забезпечує індукцію цитотоксичності незалежним чином, а також за рахунок асоціації із «згубними доменами» MORT-1, p55-R, FAS-R і TRADD. Також білок RIP включає протеїнкіназний домен в своїй N-кінцевій частині, а також проміжний домен, який, як вважається, забезпечує «перетин» (зв'язування) з білком TRAF2, таким чином включаючи його в індукцію NF-KB. Відповідно, подробиці, що стосуються параметрів і послідовностей (нуклеотидної і амінокислотної) RIP були включені в згадувані вище публікації [зокрема, Stanger et al., 1992], які включені тут для зведення у вигляді бібліографічних посилань.

Також TNF є одним з цитокінів, що беруть участь в ініціації і модуляції антивірусної активності організму-господаря. Схожим чином в еволюції вірусів сформувалася експресія генів, білкові продукти яких регулюють активність таких цитокінів, і ці цитокін-регулюючі вірусні білки, як вважається, забезпечують проникнення даного вірусу в організм тварини-реципієнта. Одним з найбільш добре вивчених прикладів таких білків є білок E3-14.7-кД, що представляє аденовіруси-С людини типів 2 і 3, який активний як могутній антагоніст цитолізу, опосередкованого TNF.

З метою виділення молекулярних компонентів сигнального каскаду TNF, який стає мішенню білка E3-17,4-кД в процесі вірусної інфекції, недавно з допомогою двохгібридного скрінінгу було виділено білок E3-17,4-кД людини (білок FIP-2 - «чотирнадцять кілодальон/взаємодіючий/білок»: «Fourteen-K interacting Protein: Y. Li et al., 1988). Було встановлено, що білок FIP-2 сам по собі не є токсичним, і, в протилежність захисному ефекту E-14,7-кД у відношенні цитотоксичності, індукується надекспресією TNFR-I або RIP поза зв'язуванням з будь-яким з двох вищезазначених білків. Було встановлено, що білок FIP-2 характеризується певним рівнем гомології з RAP-2 - білком за даним винаходом. Загальний рівень схожості між RAP-2 і FIP2 вельми низький, на що вказує повне зіставлення амінокислотних послідовностей (Fig.3). Однак, гомологія стає більш істотною по конкретних ділянках у напрямі до С-кінцевих частин цих білків, досягаючи майже повної ідентичності для 30 С-кінцевих амінокислот. Також заслуговує уваги той факт, що, крім вищезазначеного С-кінцевого домену, передбачуваний мотив типу «лейцинова блискавка» в послідовності FIP-2 в істотній мірі консервативний для RAP-2 (за винятком заміни ізолейцину на аланін).

Схожа послідовність, позначена HYPL, що кодує білок, пов'язана з хворобою Гентінгтона, яка приблизно є відособленим гомологом RAP-2, нещодавно була внесена в базу даних GenBank під назвою «білок, взаємодіючий з гентінгтином» - HYPL (депозитарний №AF049614). Проте, повідомлень про функції цього білка

доки немає.

У недавній статті Ямаоки із спіавт. [S.Yamaoka et al., 1998] повідомляється про ідентифікацію гомолога RAP-2 миші. Мишачий гомолог NEMO (ключовий модулятор чинника NF-KB) був ідентифікований при пошуку молекул, які б регулювали активацію сигнального шляху NF-KB. Був охарактеризований клітинний варіант HTLV-1 Тах-трансформованих фібробластів пацюка, позначений як 5R, який не реагував ні на один з перевірених стимулів, що активують NF-KB (LPS, PMA, IL-1, TNF), і протестовано за його генетичною комплементованості. Внаслідок цієї процедури була виділена кДНК, що кодує білок NEMO з молекулярною масою 48кД. Засновуючись на цих даних, була встановлена відсутність даного білка в клітинах 5R і його входження до високомолекулярного ІКВ-кіназного комплексу, необхідного для його формування. В моделі *in vitro* білок NEMO здатний утворювати гомодимери і напряму взаємодіяти з ІКК $\beta$ .

[У ізраїльській патентній заявці №120485] представляється RIP-асоційований білок, позначений RAP, який специфічно зв'язується з білком RIP і придушує індукцію NF-KB.

[Ізраїльська патентна заявка №123758] і дана заявка стосуються іншого RIP-асоційованого білка, позначеного як RAP-2, який характеризується такою ж або схожою активністю.

Відповідно до даного винаходу білок RAP-2 також позначається як 303, або RAP-303, або RAT-303. Для зручності далі тут він буде позначатися як RAP-2.

Об'єктом даного винаходу є представлення білка RAP-2, включаючи всі його ізоформи, аналоги, фрагменти і похідні, здатні зв'язуватися з білком RIP (тут і далі RIP, що позначається просто «RIP»). Оскільки RIP здатний напряму або опосередковано взаємодіяти з внутрішньоклітинними медіаторами запалення, цитотоксичності і (або) загибелі клітин, такими як p55-R і FAS-R, і з їх адаптерними або модуляторними білками, такими як, наприклад, MORT-1, TRADD, Mch4, MACH, G1 і іншими, то нові білки за даним винаходом за рахунок зв'язування з RIP таким чином виявляються здатні придушувати внутрішньоклітинний сигнальний каскад, що ініціюється зв'язуванням FAS-ліганду зі своїм рецептором, а TNF зі своїм рецептором (p55-R), а раз так, то нові білки за даним винаходом є модуляторами опосередкованого p55-R і FAS-R впливу на клітини. Також здатний взаємодіяти з білком TRAF2, таким чином будучи здатним взаємодіяти напряму або непрямо з NIK, а, оскільки RIP активний як модулятор запального процесу і механізмів клітинної життєздатності, що залучається до індукції чинника NF-KB, то нові білки за даним винаходом є модуляторами RIP-асоційованого запалення і активності по виживанню клітин. Таким же чином за рахунок здатності рецепторів FAS-R, p55-R і їх модуляторних білків MORT-1 і TRADD індукувати NF-KB і виживання клітин напряму або опосередковано внаслідок зв'язування з RIP або зв'язування з TRAF2, з яким зв'язується RIP, білки за даним винаходом також можуть бути медіаторами процесів підтримки життєздатності клітин за рахунок активності в тому ж або близько родинному внутрішньоклітинному сигнальному каскаді, в складі якого деякі із згаданих вище білків активні по забезпеченню виживання клітин. Схожим чином, оскільки p75-R зв'язується з TRAF2, з яким зв'язується RIP, нові білки за даним винаходом також можуть бути модуляторами RIP-пов'язаного опосередковування активності, що зумовлюється рецептором p75-R.

Іншим об'єктом даного винаходу є представлення антагоністів (наприклад, антитіл, пептидів, органічних сполук або навіть деяких ізоформ) згаданих вище нових білків RAP-2, їх ізоформ, аналогів, фрагментів і похідних, які можуть бути використані для придушення сигнальних шляхів або, що більш конкретно, запальної цитотоксичності або механізмів виживання клітин, якщо це є бажаним.

Ще одним об'єктом даного винаходу є застосування згаданих вище білків RAP-2, їх ізоформ, аналогів, фрагментів і похідних з метою виділення і охарактеризування додаткових білків або чинників, які можуть бути залучені до регуляції рецепторної активності, наприклад, інших білків, які зв'язуються з білками RAP-2 і впливають на їх активність, і (або) з метою виділення і ідентифікації інших рецепторів, розташованих вище або нижче по сигнальному ланцюжку, в якому беруть участь дані білки, їх аналоги, фрагменти і похідні, а, отже, в функціонування яких вони також залучені.

Також даний винахід представляє білки, RAP2-зв'язуючися, які здатні модулювати/опосередковувати функції RAP-2.

Ще одним об'єктом даного винаходу є представлення інгібіторів, які можуть бути внесені в клітини з метою зв'язування або взаємодії з RAP-2 і вірогідними ізоформами RAP-2, при тому, що ці інгібітори можуть придушувати RIP-асоційовану активність в процесах цитотоксичності, а, отже, коли це є бажаним, підвищувати життєздатність клітин, або які можуть придушувати RIP-асоційовану активність в процесах забезпечення виживання клітин, отже, таким чином, якщо це бажано, підвищуючи рівень цитотоксичності.

Більш того об'єктом даного винаходу є застосування згаданих вище нових білків RAP-2, їх ізоформ і аналогів, фрагментів і похідних в якості антигенів для отримання полікліональних і (або) моноклональних антитіл до них. Ці антитіла, в свою чергу, можуть бути використані, наприклад, для очищення нових білків з різних джерел, таких як клітинні екстракти або лінії трансформованих клітин.

Далі, дані антитіла можуть бути використані для цілей діагностики, наприклад, для ідентифікації захворювань, пов'язаних з аномальним функціонуванням клітинних процесів, що опосередковуються p55-R, FAS-R і іншими родинними рецепторами.

Іншим об'єктом даного винаходу є представлення фармацевтичних композицій, що містять згадані вище білки RAP-2, з ізоформами або аналоги, фрагменти або похідні, рівно як і фармацевтичні композиції, що містять згадані вище антитіла або інших антагоністів.

Відповідно до даного винаходу було виділено новий білок RAP-2. RAP-2 здатний зв'язуватися з RIP або взаємодіяти з ним, а, отже, він є модулятором або медіатором внутрішньоклітинної активності білка RIP. RIP залучений до модуляції або опосередковування внутрішньоклітинних сигнальних механізмів, наприклад, механізмів, асоційованих з цитотоксичністю або загибеллю клітин, в яких RIP має власною цитотоксичністю і в зв'язку, прямому або опосередкованому, з рядом інших білків загибелі клітин, таких як, наприклад, MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1, p55-R і p75-R, з якими RIP може зв'язуватися або інакше асоціюватися напряму або непрямо через мотив «домену загибелі», присутній в послідовності RIP і в складі всіх інших вище перелічених білків; іншим механізмом є механізм запалення, клітинної життєздатності або виживання, в яких RIP може

належати роль прямого або непрямого активатора завдяки наявності кіназного мотиву або домену в складі послідовності RIP і здатності RIP зв'язуватися з білком TRAF2, який може зв'язуватися з кіназою NIK, яка, в свою чергу, напряму залучена до активації транскрипційного чинника NF-KB, який грає ключову роль в запаленнях і здатності до виживання клітин. Крім того, рецептор p55-R також здатний взаємодіяти з TRADD і TRAF2 (через TRADD) і також залучений до активації NF-KB, таким чином беручи участь в механізмі виживання, а, отже, RIP за рахунок здатності зв'язуватися або взаємодіяти з FAS-R, TRADD і p55-R (через TRADD), рівно як і з TRAF2, також може бути залучений до модуляції запалення і активації виживання клітин з участю цих білків. Відповідно, RIP є модулятором або медіатором цих механізмів і схожим чином новий білок RAP-2 за даним винаходом за рахунок зв'язування з RIP є модулятором або медіатором згаданих внутрішньоклітинних механізмів.

RAP-2 було виділено і клоновано з використанням двохгібридної дріжджової системи, секвеновано і охарактеризовано: у відповідності з детально описаним нижче, RAP-2 розглядається як високоспецифічний білок, що RIP-зв'язується, отже, що є модулятором/медіатором RIP. RAP-2 не зв'язується з TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R і MACH. Крім того, передбачається, що RAP-2 не включає характерного модуля або мотиву «згубний домен», що відповідає тому, що сам по собі RAP-2 не зумовлює цитотоксичності.

По використанню протягом подальшого тексту поняття «RIP-активність» закликаю включити його активність по модуляції/опосередкованню запалень і механізмів загибелі і виживання клітин. Ця активність визначається тут вище і тут нижче, рівно як, і у всіх публікаціях, що цитувалися і патентних заявках, повний зміст яких включено для зведення у вигляді бібліографічних посилань. Подібним чином по використанню в даному тексті поняття «активність RAP-2» закликаю включити в себе модуляцію/опосередковання активності RIP за рахунок специфічного зв'язування з RIP, при тому, що така модуляція/опосередковання RIP дією RAP-2 включає модуляцію/опосередковання механізмів запалень, загибелі клітин і виживання клітин, в які RIP залучений напряму або непрямо, а раз так, то такий RAP-2 може розглядатися як посередній модулятор/медіатор всіх перерахованих вище білків, а, мабуть, і ряду інших чинників, що беруть участь в запаленнях, загибелі клітин або виживанні клітин, з якими зв'язується RIP, або з якими RIP взаємодіє напряму або опосередковано.

Також даний винахід представляє два нових RAP2-зв'язуючих білка, ідентифікованих в двохгібридній дріжджовій системі з використанням як «наживки» повно розмірної амінокислотної послідовності білка RAP-2.

Застосовуючи повно розмірний білок RAP-2 як «наживку» в двохгібридній системі, був виявлений новий RAP2-взаємодіючий білок, що позначається в даному тексті як клон №10 (або №10-кодований білок, або RAT-зв'язуючий білок №10, або RBP-10). Послідовність виділеної кДНК була далі визначена за допомогою стандартних методів секвенування, відомих в даній області техніки, в сторону 5 і з виділенням часткової відкритої кодуючої рамки даного білка, позбавленої, однак, старт-кодону.

Аналіз в двохгібридній системі репертуару зв'язування клону №10 показав, що цей білок не тільки зв'язується з RAP-2, але також виявляє досить могутню афінність у відношенні TRAF2. Однак, клон №10 не зв'язується з RIP, TRADD, MORT-1, MACH, TNFR-1, TIP60 і NIK, рівно як і з деякими контрольними білками (наприклад, ламіном і циклином-D). Однак, не можна виключати, що зв'язування клону №10 з кіназою NIK може бути виявлене в клітинах ссавців, виходячи з параметрів NIK в клітинах дріжджів. Як було показано, клон №10 зв'язується з RAP-2 в межах С-кінцевих 200 амінокислот послідовності останнього, тобто дільниці, необов'язково зв'язуючої з RIP, TIP60, NIK і IKK $\beta$ . Ця послідовність, однак, неточна, що привело до необхідності проведення декількох кіл пошуку бази даних Gen-Bank з метою ідентифікації гомологів клону №10. Єдиним білком, що виявив істотну міру схожості з білком, що кодується клоном №10, виявився білок F40F12.5 -гіпотетична молекула нематоди *C.elegans*, для якої точна фізіологічна роль доки не встановлена.

Цікаво, що F40F12.5, як було встановлено, характеризується певною схожістю з деякими представниками високо консервативної родини контрольованих убіквітином протеаз. Ці ферменти врівноважують деструктивні наслідки активності убіквітинової системи, яка, як відомо, «керує» більшістю клітинних процесів руйнування білків. При тому, що убіквітинлігази забезпечують прикріплення поліубіквітинової структури до призначеного до руйнування білка, убіквітинпротеази запобігають ефективному «розгалуженню» цієї структури. Таке припущення про функції F40F12.5, засноване на схожості згадуваних вище контрольованих убіквітином протеаз, однак залишається під питанням, тому що не був досліджений можливий вияв цим білком якої-небудь каталітичної активності по відношенню до поліубіквітину. Більш того ряд положень роблять даний збіг малоймовірним:

(а) амінокислотні залишки, які, як вважається, складають основу каталітичної дільниці в будь-якому з підкласів убіквітинпротеаз, не є консервативними ні в F40F12.5, ні в клоні №10;

(б) за винятком їх каталітичних сайтів, ферменти, що відносяться до контрольованих убіквітином протеаз, що походять від різних видів (від бактерій до людини), не виявляють будь-якої істотної схожості послідовностей, в той час як F40F12.5 і клон №10 характеризуються наявністю певного рівня гомології.

Таким чином, передбачається, що RAP-2 є специфічним, RIP-зв'язуючим білком і, отже, модулятором/медіатором внутрішньоклітинної активності RIP. RAP2-зв'язуючі білки, завдяки їх здатності зв'язуватися з RAP-2, виявляють посередній вплив на RIP і таким шляхом також є модуляторами/медіатором внутрішньоклітинної активності RIP.

Таким чином, RAP-2 можливо грає роль модулятора/медіатора активності по запаленням, виживанні клітин і (або) загибелі клітин, в які RIP залучений напряму або непрямо, особливо тих, які пов'язані з цитотоксичністю і запальними процесами, що зумовлюються або різними стимулами, що індукуються, включаючи ті, які передаються рецепторами родини рецепторів TNF/NGF, а також, можливо, і іншими (по схемі участі RIP в таких внутрішньоклітинних процесах, а, отже, участь RAP-2, див. Фіг.1 в публікації Malinin et al., 1997).

Також RAP-2 може служити інгібітором цитотоксичності і запалень за рахунок його присутності як частина комплексу з іншими білками, наприклад, RIP, і білками, що зв'язуються з RIP, а раз так, то він може порушувати цитотоксичність або запальні прояви цих інших білків (наприклад, p55-R, FAS-R, MACH, Mch4, G1 і

MORT-1), що зрештою зумовлює придушення їх цитотоксичної активності або їх запальної активності.

Також RAP-2 може служити як підсилювач або індуктор цитотоксичності і запалення, що забезпечується активністю інших білків, наприклад, RIP і інших зв'язуючихся з RIP білків відповідно до вказаного вище, маючи на меті рекрутинг цих білків з участю RIP, при тому, що такий рекрутинг служить для забезпечення цитотоксичної активності з участю різних білків або для забезпечення їх запальної активності.

Також аналогічним чином RAP-2 може служити в якості інгібітору або індуктора механізму виживання клітин відповідно до відміченого вище за рахунок залучення RIP до роботи цього механізму.

Відповідно, даний винахід представляє послідовність ДНК, що кодує RIP-асоційований білок (RAP-2), його ізоформи, аналоги або фрагменти, здатні зв'язуватися з RIP і модулювати або опосередковувати внутрішньоклітинну активність RIP, при тому, що згадана внутрішньоклітинна активність пов'язана з модулюванням/опосередкуванням запалень і (або) загибелі клітин, і (або) виживання клітин.

Зокрема, даний винахід представляє послідовність ДНК, вибрану з групи, яка включає:

(а) послідовність ДНК, похідну від кодуючої ділянки нативного білка RAP-2;

(б) послідовності ДНК, здатні гібридизуватися з послідовністю (а) в умовах середньої міри жорсткості, які кодують біологічно активний білок RAP-2; і

(в) послідовності ДНК, які відрізняються внаслідок вираженості генетичного коду від послідовностей ДНК, визначених в (а) і (б), які біологічно активний білок RAP-2.

Іншим конкретним варіантом вищезазначеної послідовності ДНК за даним винаходом є послідовність ДНК, що включає принаймні частину послідовності, що кодує принаймні одну ізоформу білка RAP-2. У іншому варіанті вищезазначеною послідовністю ДНК є послідовність гену білка RAP-2 відповідно до показаного на Фіг.1. Ще в одному варіанті представляється послідовність ДНК, показана на Фіг.2.

Даний винахід представляє білки RAP-2, а також їх аналоги, фрагменти або похідні, що кодуються будь-якою з вищезгаданих послідовностей за даним винаходом, при тому, що згадані білки, аналоги, фрагменти і похідні здатні зв'язуватися з RIP і модулювати/опосередковувати його біологічну активність відносно внутрішньоклітинних механізмів загибелі клітин і (або) виживання клітин.

Конкретний варіант даного винаходу представляє білки RAP-2 і їх аналоги, фрагменти і похідні. Амінокислотна послідовність білка RAP-2, розшифрована по послідовностях ДНК, показаних на Фіг.1 і 2, показана на Фіг.3. У іншому варіанті представлена будь-яка ізоформа білка RAP-2, її аналоги, фрагменти і похідні.

Також даним винаходом представляються компетентні по реплікації експресійні системи, що включають згадану вище ДНК, при тому, що ці компетентні по реплікації експресійні системи здатні експресуватися у відповідних прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-господарях; а також спосіб вироблення білка RAP-2 або його аналогів, фрагментів або похідних за даним винаходом шляхом культивування трансформованих клітин-господарів в умовах, сприятливих для експресії згаданих білка, його аналогів, фрагментів або похідних, для здійснення посттрансляційних модифікацій згаданого білка, якщо це необхідно для отримання згаданого білка, і для екстрагування згаданого експресованого білка, його аналогів, фрагментів або похідних із культурального середовища згаданих трансформованих клітин або з екстрактів згаданих трансформованих клітин. Приведені вище визначення покликані включити всі ізоформи білка RAP-2.

У іншому аспекті даний винахід також представляє антитіла або їх активні похідні або фрагменти, специфічні відносно білка RAP-2, його аналогів, фрагментів і похідних за даним винаходом.

У ще одному аспекті даного винаходу представляються різні шляхи застосування згаданих вище послідовностей ДНК або білків, які вони кодують відповідно до даного винаходу, при тому, що, крім інших, можуть бути такі шляхи застосування:

(1) Спосіб модулювання внутрішньоклітинних механізмів запалення, загибелі клітин і (або) виживання клітин, що модулюються або опосередковуються білком RIP, RIP<sub>1</sub> модулювання внутрішньоклітинних механізмів запалення, загибелі кл RAP-2, їх ізоформ, аналогів, фрагментів або похідних, здатних зв'язуватися з RIP, при тому, що згадана обробка згаданих клітин включає внесення в згадані клітини згаданих одного або декількох білків, їх ізоформ, аналогів, фрагментів або похідних в формі, придатній для проникнення їх всередину клітини, або внесення в згадані клітини послідовності ДНК, що кодує згадані один або декілька білків, їх ізоформ, аналогів, фрагментів або похідних, в формі відповідного вектору, що включає згадану послідовність, при тому, що вказаний вектор здатний забезпечувати вбудовування згаданої послідовності в згадані клітини таким шляхом, щоб згадана послідовність експресувалась в згаданих клітинах.

(2) Спосіб модулювання механізмів запалення, загибелі клітин і (або) виживання клітин, опосередковуваних лігандами родини TNF за рахунок впливу на клітини через вплив на білок RIP у відповідності з п.(1), при тому, що згадана обробка клітин включає внесення в згадані клітини згаданих білка RAP-2 або його ізоформ, аналогів, фрагментів або похідних в формі, придатній для проникнення всередину клітини, або внесення в згадані клітини послідовності ДНК, що кодує вказаний білок RAP-2 або його ізоформи, аналоги, фрагменти або похідні, при тому, що вказаний вектор здатний забезпечувати вбудовування згаданої послідовності в згадані клітини таким шляхом, щоб згадана послідовність експресувалась в згаданих клітинах.

(3) Спосіб, описаний в (2), де згадана обробка згаданих клітин здійснюється шляхом трансфекції згаданих клітин рекомбінантним вектором на основі вірусу тваринного, що включає наступні етапи:

(а) конструювання рекомбінантного вектора на основі вірусу тварини, що включає послідовність, що кодує поверхневий вірусний білок (ліганд), який здатний зв'язуватися на специфічному поверхово-клітинному рецепторі на поверхні клітини, несучій рецептор FAS-R або p55-R, а також другу послідовність, що кодує білок, вибраний з білка RAP-2 і його ізоформ, аналогів, фрагментів і похідних, які, у разі експресії в згаданих клітинах, здатний модулювати/опосередковувати внутрішньоклітинні механізми запалень, загибелі клітин і (або) виживання клітин.; і

(б) інфікування згаданих клітин згаданим в (а) вектором.

(4) Спосіб модулювання механізмів запалення, загибелі клітин і (або) виживання клітин, опосередкованих впливом лігандів родини TNF на клітини через вплив на білок RIP, що включає обробку згаданих клітин

антитілами або їх активними фрагментами або похідними відповідно до даного винаходу, при тому, що згадана обробка здійснюється за допомогою відповідної композиції, що містить згадані антитіла, їх активні фрагменти або похідні, відносно згаданих клітин, при тому, що, коли принаймні частина білка RAP-2 попадає на зовнішню поверхню клітини, згадана композиція формується для позаклітинного застосування, а коли згадані білки RAP-2 є повністю внутрішньоклітинними, то згадана композиція формується для внутрішньоклітинного застосування.

(5) Спосіб модулювання механізмів запалення, загибелі клітин і (або) виживання клітин, опосередкованих впливом лігандів родини TNF на клітини через вплив на білок RIP, що включає обробку згаданих клітин олігонуклеотидною послідовністю, що кодує протисмислову послідовність по відношенню принаймні до частини послідовності білка RAP-2 за даним винаходом, при тому, що згадана олігонуклеотидна послідовність здатна блокувати експресію білка RAP-2.

(6) Спосіб описаний (2), призначений для обробки пухлинних клітин або ВІЛ-інфікованих клітин, або хворих клітин іншого типу, що включає:

(а) конструювання рекомбінантного вектора на основі вірусу тварини, що включає послідовність, що кодує вірусний поверхневий білок, здатний зв'язуватися на специфічному рецепторі поверхні пухлинних клітин або на рецепторі поверхні ВІЛ-інфікованих клітин, або на рецепторі, що знаходиться на інших хворих клітинах, а також послідовність, що кодує білок, вибираний з білка RAP-2, його аналогів, фрагментів і похідних за даним винаходом, які, будучи експресовані в згаданих пухлинних, ВІЛ-інфікованих або інших хворих клітинах, здатний знищувати згадану клітку через взаємодію з білком RIP; і

(б) інфікування згаданих пухлинних або ВІЛ-інфікованих клітин або інших хворих клітин згаданим в (а) вектором.

(7) Спосіб модулювання механізмів загибелі клітин і (або) виживання клітин, опосередкованих впливом лігандів родини TNF на клітини через білок RIP, що включає застосування рибозимної процедури, в якій вектор, що кодує рибозимну послідовність, здатну взаємодіяти з клітинною послідовністю мРНК, яка кодує білок RAP-2 за даним винаходом, вносять в згадані клітини в формі, яка забезпечує експресію згаданої рибозимної послідовності в згаданих клітинах, при тому, що, коли згадана рибозимна послідовність експресується в згаданих клітинах, вона взаємодіє із згаданою клітинною послідовністю мРНК і розщеплює згадану послідовність мРНК, внаслідок чого відбувається придушення експресії згаданого білка RAP-2 в згаданих клітинах.

(8) Спосіб, вибираний з перерахованих вище способів за даним винаходом, при тому, що згадана кодуюча послідовність білка RAP-2 включає принаймні будь-яку одну з ізоформ, аналогів, фрагментів і похідних RAP-2 відповідно до даного винаходу, яка здатна зв'язуватися з RIP.

(9) Способи виділення і ідентифікації білків відповідно до даного винаходу, здатних зв'язуватися з білком RIP, що включають застосування двохгібридної дріжджової системи, в якій послідовність, що кодує вказаний білок RIP входить до складу одного гібридного вектора, а послідовність з бібліотеки кДНК або геномної клонотеки входить до складу другого гібридного вектора, при тому, що ці вектори потім використовуються для трансформації дріжджових клітин-господарів з виділенням позитивно трансформованих клітин і подальшою екстракцією згаданого другого гібридного вектору для виділення послідовності, що кодує білок, який зв'язується із згаданим білком RIP.

(10) Спосіб відповідно до будь-кого з перерахованих вище пп.(1)-(9), при тому, що згаданим білком RAP-2 є будь-яка з ізоформ RAP-2, будь-який з її аналогів, фрагментів і похідних.

(11) Спосіб відповідно до будь-якого з перерахованих вище (1)-(10), при тому, що білок RAP-2 або будь-хто з його ізоформ, аналогів, фрагментів або похідних залучені до модуляції клітинного вияву, опосередкованого або будь-якого іншого медіатора, що модулюється з участю або індуктора, з яким згадані білок RAP-2, його ізоформа, аналог, фрагмент або похідне здатні зв'язуватися напряду або опосередковано.

Даний винахід також представляє фармацевтичну композицію, призначену для модулювання механізмів запалень, загибелі клітин і (або) виживання клітин, опосередкованих впливом білків родини TNF на клітини через вплив на білок RIP або впливом будь-якого іншого медіатора або індуктора на клітини відповідно до того, що вказувався вище, що містить як активний компонент одне з наступного:

(1) білок RAP-2 відповідно до даного винаходу і біологічно активні фрагменти, аналоги, похідні і їх суміші;

(2) рекомбінантний вектор на основі вірусу тварини, кодуючий білок, здатний зв'язуватися на поверхню-клітинному рецепторі, і кодуючий білок RAP-2 або біологічні активні фрагменти або аналоги за даним винаходом;

(3) олігонуклеотидну послідовність, що кодує протисмислову послідовність послідовності білка RAP-2 за даним винаходом, при тому, що вказаний олігонуклеотид може бути другою послідовністю в складі вищезазначеного (2) рекомбінантного вектору на основі вірусу тварини.

Також даний винахід представляє:

I. Спосіб модулювання запалення, внутрішньоклітинних механізмів загибелі клітин і (або) виживання клітин, що модулюються/опосередкованих білком RIP, або впливу на клітини будь-якого іншого медіатора або індуктора, або будь-якого іншого індуктора або інгібітору транскрипційного чинника NF-KB, що включає обробку згаданих клітин у відповідності зі способом по будь-якому з приведених вище пп. (1)-(10) білками RAP-2, його ізоформами, аналогами, фрагментами або похідними або послідовностями, що кодують білки RAP-2, його ізоформи, аналоги або фрагменти, при тому, що згадана обробка зумовлює посилення або придушення згаданого RIP-опосередкованого ефекту, а таким чином і ефекту, опосередкованого FAS-R або p55-R, або згаданим іншим медіатором або індуктором, або іншим індуктором або інгібітором NF-KB.

II. Спосіб, такий же як вказано вище, при тому, що згадані білок RAP-2, його аналог, фрагмент або похідне є тією частиною білка RAP-2, яка специфічно залучена до зв'язування з RIP або із згаданим іншим медіатором або індуктором, або іншим індуктором або інгібітором NF-KB, або згадана послідовність білка RAP-2 кодує ту частину білка RAP-2, яка специфічно залучена до зв'язування з RIP або із згаданим іншим медіатором або індуктором, або іншим індуктором або інгібітором NF-KB.

III. Спосіб, такий же як вказано вище, при тому, що вказаний білок RAP-2 представлений будь-яким з ізоформ RAP-2, при тому, що згадані ізоформи здатні посилювати ефект дії RIP.

IV. Спосіб, такий же як вказано вище, при тому, що вказаний білок RAP-2 є будь-яким з ізоформ RAP-2, при тому, що згадані ізоформи здатні придушувати дію RIP або дію на клітини іншого медіатора або індуктора, таким чином також придушуючи дію FAS-R або p55-R на клітини або дію на клітини іншого цитотоксичного медіатора або індуктора.

V. Спосіб, такий же як вказано вище, при тому, що згадані білок RAP-2, його ізоформа, аналог, фрагмент або похідне здатні посилювати або придушувати RIP-асоційований вплив на запалення і механізм виживання клітин за рахунок прямого або опосередкованого придушення NF-KB або прямої або непрямої активації кінази JNK і p38.

Виділення білків RAP-2, їх ідентифікація і охарактеризування можуть бути здійснені із застосуванням будь-якого з стандартних процедур, що використовуються для виділення і ідентифікації білків, наприклад, двохгібридної дріжджової системи, методів афінної хроматографії і будь-яких інших добре відомих стандартних процедур, що застосовується для подібних цілей.

Ще в одному аспекті даного винаходу сам по собі білок RAP-2 або його ізоформа, фрагмент або похідне застосовується як «приманка» в двохгібридній дріжджовій системі для пошуку білків, що з ними зв'язуються.

Білки, які зв'язуються з RAP-2, його ізоформами, фрагментами або похідними, також входять в об'єм даного винаходу.

Інші аспекти і варіанти даного винаходу також представляється з урахуванням викладеного в нижченаведеному докладному описі даного винаходу.

Необхідно зазначити, що при використанні протягом даного тексту терміни «модуляція/опосередкування RIP, або FAS-ліганду, або вплив TNF на клітини», а також будь-які інші, наприклад «модуляція/опосередкування», що використовуються в описі, покликані охопити як обробку *in vitro*, так і *in vivo*, а також, крім того, придушення або посилення/зумовлення.

На Фіг.1 (A, B) (SEQ ID NO 1) показана нуклеотидна послідовність гену RAP-2: старт-і стопи-кодони підкреслено. Стрілка вказує на початок 1500-нуклеотидного клону, отриманого при двохгібридному скрінінзі.

На Фіг.2 (A, B) (SEQ ID NO 2) показана нуклеотидна послідовність клону №41072 (див. приклад I): старт-і стопи-кодони підкреслені.

На Фіг.3 A (/1, /2) показані розшифровані амінокислотні послідовності сплайсінгових варіантів людини (повний 20.4 і Human shrt) і миші (повний NEMO і Mouse part) RAP-2, а B (/1 /2) показує опубліковану послідовність FIP-1, зіставлену на основі програми, отриманій від BCM Search Launcher (Baylor Coll. Med., Houston, TX). Гомологічні амінокислоти обведені, ідентичні амінокислоти затінені. Зірочки (B) означають передбачуваний мотив типу «лейцинової блискавки» в послідовності FIP-2.

На Фіг.4 проілюстрована молекулярна характеристика RAP-2. На A показані дані Нозерн-блотингу MTN Blot I (Clontech) людини з ДНК-фрагментом RAP-2. На B відображений аналіз зв'язування RAP-2 з RIP, детально описаний в прикладі 3. На C визначено взаємодію NIK/RAP-2, як і на B, за винятком того, що антибіла анти-FLAG були використані в методі Вестерн-блотингу з подальшою імунопреципітацією з антитілом до гексагістидину. Стрілка позначає положення імунопреципітованих білків.

На Фіг.5 показано графік негативної регуляції активації NF-KB і c-Jun дією різних стимулів під впливом ектопічної експресії RAP-2 відповідно до описаного в прикладі 4. Клітини лінії HEK-293T були трансфіковані по типу, що переважається репортерною плазмідом (HIVLTR-Luc або CMV-Luc для варіанту з NF-KB і GAL4-Luc для варіанту з c-Jun [B] тестів на активацію), експресуючим вектором для відповідного індуктора і або порожньою плазмідом (pcDNA3 - помічена на Фіг. окремо), або плазмідом, що кодує повно розмірний RAP-2 (pcRAP-2 - помічена на Фіг. плюсом). Рівень активації репортерного люциферазного гену виражали у «відносних люциферазних одиницях» (R.L.U.).

На Фіг.6 показано, що RAP-2 виявляє схожу репресивну активність у відношенні NF-KB і c-Jun в широкому діапазоні концентрацій. Білок TRAF2 був експресовано по типу, що переважається в клітинах HEK-293T нарівні з різними вказаними кількостями конструкцій або pcRAP-2 (смыслова), або pcRAP-2-a/s (протисмыслова). Для оцінки активації NF-KB (A) і c-Jun (B) включали репортерці плазмід, відповідно, рHIVLTR-Luc і рGAL4-Luc. Люциферазний, тест проводили відповідно до описаного для фігури 5 в прикладі 4.

На Фіг.7 показано, що RAP-2 має могутній потенціал по сигналу до фосфорилування c-Jun без порушення рівня активації кінази JNK1/2.

(A) Тотальні лізати клітин HEK-293T, трансфікованих вказаними експресуючими конструкціями або з pcDNA3-носієм, позначеної на Фіг. знаком «мінус» (-), або pcRAP-2, позначеної на Фіг. знаком «плюс» (+), були ідентифіковані з допомогою Вестерн-блотингу з використанням антибіла до фосфорильованого Jun відповідно до описаного в прикладі 5. Контроль, показаний на нижньому малюнку, було повторно гібридизовано з антибілами до загального антигену c-Jun (NEB).

(B) Активовану JNK1/2 з клітин HEK-293T, трансфікованих або pcDNA3, або pcRAP-2, оброблених hrTNF- $\alpha$  з метою збільшення періоду часу, виявляли з допомогою Вестерн-блотингу тотальних лізатів з використанням антибіла до фосфорильованої кінази JNK, що детально описано в прикладі 5.

(C) Клітини HEK-293T були котрансфіковані порожнім вектором, pcDNA3 і pcRIP в різних сполученнях разом з плазмідом, експресуючою HA-JNK1. Потім JNK1 імунопреципітували по його N-кінцевому маркеру HA, а її здатність фосфорилувати бактерійний очищений химерний антигенний GST-Jun визначали в кіназному тесті *in vitro*. Продукти цієї реакції аналізували методом електрофорезу в SDS-ПААГ. Стрілкою відмічений GST-Jun.

На Фіг.8 показано, що RAP-2 не конкурує з NF-KB і AP-1 за зв'язування з ДНК. Клітини HEK-293T були трансфіковані вказаними білками або по окремі (-), або разом з pcRAP-2 (+). Ядерні екстракти, отримані з цих клітин, інкубували з <sup>32</sup>P-поміченими олігонуклеотидами, що включають класичні розпізнаючі послідовності для AP-1 (A) або для NF-KB (B). Продукти реакції аналізували електрофоретично в неденатуруючому ПААГ.

На Фіг.9. показано, що RAP-2 придушує вихідний рівень NF-KB в клітинах HEK-293T і HeLa, непостійно



трансфікованих різною кількістю або RAP-2 (смилова), або RAP-2-a/s (протисмилова). Всі маніпуляції були здійснені відповідно до описаного для Фіг.6 в прикладі 4.

На Фіг.10 (A, B) (SEQ ID NO 3) показано часткова нуклеотидна послідовність клону №10.

На Фіг.11 відображені функціональні властивості послідовних делецій RAP-2. На А дано схематичне уявлення послідовних С-кінцевих делецій в RAP-2. Всі варіанти скорочення зберігають повністю N-кінцеву частину RAP-2, в той час як їх С-кінцеві дільниці позначені стрілками. Дільниці зв'язування RIP, NIK, IKK $\beta$  і TIP60 підкреслені. Три заштрихованих області відповідають передбачуваним мотивам типу «лейцинової блискавки». На В показаний ефект надекспресії делеційних конструкцій, описаних в А, на активацію NF-KB в клітинах HEK-293T під дією RelA, TRAF2, TNF і NIK з використанням для NF-KB репортерної люциферазної плазмиди HIV-LTR-Luc. Рівень активації репортерного люциферазного гену виражали у «відносних люциферазних одиницях» (R.L.U.).

На Фіг.12 показане картирування функціональних і зв'язуючих дільниць в RAP-2:

(А) Різні делеції в складі RAP-2 були протестовані щодо їх здатності зв'язувати вказані білки в трансфікованих клітинах дріжджів (непарні стовпці) і клітинах ссавця HEK-293T (парні стовпці). У двох розташованих з правого краю стовпців показана здатність одних і тих же делецій, трансфікованих в клітини HEK-293T у великому об'ємі, що детально описане в прикладі 9, придушувати активацію NF-KB і зумовлювати гіперфосфорилування c-Jun у відповідь на обробку TNF- $\alpha$ . Опуклість перехрестя пропорційна інтенсивності даного ефекту. Стрілки вказують на те, що ефекти помічених конструкцій, що спостерігаються відносно стимуляції RelA диференційовані (див. Фіг.11У).

(В) Узагальнююча схема, що представляє розташування зв'язуючих (верхня частина) і функціональних (нижня частина) дільниць RAP-2 у відповідності з даними делеційного аналізу, показаного на (А), протягом осової структури даного білка. Заштриховані дільниці вказують на можливе положення кордонів відповідних мінімальних сегментів.

На Фіг.13 показано, що залишок серину-148 в послідовності RAP-2 є суттєвим для його здатності індукувати гіперфосфорилування по залишку серину-63.

Показаний Вестерн-блот, в якому «wt» позначає дикий тип, S148F позначає заміну серина на аланін в 148-м положенні, а «vector» відповідає контрольному («порожньому») вектору.

У одному з своїх аспектів даний винахід стосується нових білків RAP-2, які здатні зв'язуватися з білком RIP, таким чином опосередковуючи або модулюючи внутрішньоклітинну активність RIP, особливо тоді, коли RIP залучений до модуляції або опосередковування механізмів запалень, загибелі клітин і (або) виживання клітин, що детально було описано вище. Таким чином, RAP-2 може придушувати активність RIP в механізмах загибелі клітин, запалень і виживання клітин, RAP-2 може посилювати активність RIP в механізмах запалень, загибелі або виживання клітин, або ж він посилює активність RIP в одному з цих механізмів, придушуючи його в інших механізмах.

Більш конкретно, відповідно до даного винаходу представляється новий білок RAP-2. Білок RAP-2 було секвеновано і охарактеризований, і було встановлено, що RAP-2 є RIP-зв'язуючим білком, що характеризується специфічністю у відношенні RIP, але не виявляє властивостей зв'язування відносно ряду білків, для яких відома участь у внутрішньоклітинних сигнальних механізмах, які пов'язані із запальними процесами, загибеллю клітин або виживанням клітин. Також RAP-2, мабуть, не має в своєму складі доменів, звичайних для білків, які активні в будь-якому з цих механізмів, тобто RAP-2 не включає мотиву або модуля «домену загибелі», він не включає кіназного мотиву або домену і він не включає протеазного мотиву або домену. Встановлена послідовність RAP-2 також є унікальною послідовністю відносно послідовностей, що використовувалися для порівняння з рядом баз даних, включаючи GeneBank і бази даних Human Genome level 1 і «dbest». Як уточнювалося вище (також з посиланням на всі згадувані публікації і патентні заявки) за RIP залучений у внутрішньоклітинні механізми запалення, загибелі клітин і виживання клітин. Отже, регуляція або контроль активності RIP можуть впливати на будь-кого з цих механізмів або на всі ці механізми тоді, коли вони ініціюються, наприклад, у відповідь на зв'язування TNF або FAS-ліганду на своїх рецепторах (зокрема, на p55-R, як рецепторі TNF). RIP може грати ключову роль у визначенні того, який механізм активується в більшій мірі, що визначається здібністю до зв'язування з рядом цитотоксичних білків, що включають в своїй послідовності «згубні домени», а також з рядом білків, що мають кіназну активність. Відповідно, такі білки як білок RAP-2 за даним винаходом, які можуть специфічно зв'язуватися з RIP, можуть грати важливу роль в модулюванні активності RIP, таким чином модулюючи міру індукції одного з вказаних механізмів в порівнянні з іншими. Отже, білок RAP-2 за даним винаходом представляє собою найважливіший модулятор або медіатор внутрішньоклітинних сигнальних шляхів.

У доповнення до повно розмірного білка RAP-2 за даним винаходом були клоновані більш короткі кДНК, для яких була встановлена наявність «блоків» послідовностей, похідних від деяких взаємно віддалених дільниць «повної» кДНК, причиною чого може бути альтернативний сплайсинг того ж самого гену. Мишачий гомолог гену RAP-2 людини був ідентифікований в аналогічному скрінінзі пулу маркерів EST миші. Як було встановлено, часткова послідовність кДНК миші по суті ідентична своєму гомологу людини на дільниці кодуючої рамки.

Фізіологічне значення взаємодії RIP/RAP-2 було додатково підтверджене при трансфікуванні клітин ліній HEK-293T і HeLa. Однак, утворення такого комплексу не приводило до каталітичної активності RIP, на що вказувала відсутність фосфорилування RAP-2 при надекспресії RIP.

Експерименти по трансфекції в клітинах HEK-293T ссавця також підтвердили утворення стабільного комплексу білків RAP-2/NIK.

RAP-2, мабуть, є ключовим елементом передачі сигналів в ланцюгу чинників NF-KB і c-Jun, оскільки він зв'язується з NIK, IKK $\beta$  і TIP60 (ацилтрансфераза гістонів) і модулює транскрипцію, залежну від NF-KB і c-Jun. Дійсно, посилена ектопічна експресія RAP-2 зумовлює придушення пов'язаної з NF-KB відповіді, в той час як видалення цього білка з клітини із застосуванням протисмилової конструкції зумовлює посилення трансактивації NF-KB і c-Jun.

Також було встановлено, що RAP-2 має потенціал по гіперфосфорилюванню c-Jun, яке не опосередковується активністю кінази JNK. RAP-2 не придушує зв'язування c-Jun і RelA з ДНК. Зв'язуючі і функціональні домени в складі RAP-2 були ідентифіковані при секвенуванні делеційних варіантів. Ці дослідження дозволили встановити, що дільниці зв'язування RIP, NIK і TIP60 перекриваються і знаходяться в районі амінокислотних залишків 95-264 послідовності RAP-2. Подальші функціональні ефекти, опосередковані білком RAP-2, однак, як було з'ясовано, пов'язані з N-кінцевим доменом даного білка, що охоплюється амінокислотами 1-264.

З точки зору висловленої вище, RAP-2, мабуть, є ключовим елементом процесів регуляції сигналів в механізмі реакції на стреси: ектопічна експресія смислової конструкції придушує відповідь, в той час як протисмислова конструкція посилює таку відповідь. Дійсно, RAP-2 також відомий в лабораторії, в якій працюють заявники, як білок RAT (білок-атенюатор RIP): тому в даному тексті він також позначається як RAT і (або) RAT-303, і (або) клон 303.

Існування множинних сплайсінгових варіантів вказує на те, що, принаймні частково, «розгалужений» ефект дії RAP-2 при конкретних умовах, мабуть, визначається присутністю декількох «блоків послідовностей», які є необхідними для зв'язування, поміщення, переміщення і модифікацій даного білка у вигляді його переважаючої ізоформи. Наприклад, якщо, дійсно, зв'язування RAP-2 з TIP60 визначається ядерною локалізацією RAP-2, то можна передбачити, що варіанти RAP-2 з втраченим при сплайсинзі сигналі ядерної локалізації (NLS) можуть перетворюватися в дефектні, або, з іншого боку, надзвичайно активні в придушенні NF-KB/AP-1 варіанти. Проведене секвенування не показало того, що RAP-2 включає декілька кластерів позитивно заряджених амінокислот (глутамінова кислота, лізин і аргінін), характерних для більшості відомих сигнальних мотивів NLS.

Зв'язування RAP-2 з RIP було встановлено по тій дільниці білка RAP-2, яка починається на амінокислотах 177-218 і закінчується на 264-й амінокислоті. RIP-зв'язуючий домен в складі RAP-2 не перекривається ні із сайтом зв'язування IKK $\beta$ , ні із сайтом зв'язування NIK.

Зв'язування з TIP60, що є членом родини ядерних білків, що визначаються як ацетилтрансферази гістонів, картується на дільниці, відповідній амінокислотам 95-264. Дільниця, залучена в гомодимеризацію, була встановлена на амінокислотах 217-264.

Накопичені дані підтверджують, що всі функціональні вияви RAP-2 (а саме придушення NF-KB і індукція гіперфосфорилювання c-Jun) картується на одній і тій же дільниці.

Білок, що кодується клоном №10, мабуть, зв'язується на дільниці, що починається між амінокислотами 218-309 і що закінчується на амінокислоті 416, а, отже, його зв'язуючий сайт може включати дільниці, що перекриваються, сайтів зв'язування з RIP, NIK, IKK $\beta$  і TIP60.

Далі, можливо, що дільниця, істотна в зв'язку з ефективною модуляцією сигналів, що зумовлюються всіма індукторами, знаходиться в N-кінцевій дільниці даного білка.

Дільниця, що покривається амінокислотами 95-416, має деякий ефект, який, однак, істотно слабше в порівнянні з тим, який зумовлюється повно розмірним білком, що, отже, може визначатися посиленою агрегацією ендogenous білка RAP-2.

Більш того за винятком RelA, всі індуковані в проведених заявниками експериментах ефекти можуть бути викликані по мінімуму приблизно сотнею N-кінцевих амінокислот послідовності білка RAP-2. Дійсно, навіть фрагмент з амінокислотами 1-102 зумовлює виразний ефект, хоч і вельми середній по силі.

З іншого боку, придушення RelA-опосередкованого ефекту вимагає присутності більшої частини білка RAP-2. У зв'язку з цим заявниками були визначені кордони такої дільниці в складі амінокислот 1-264, який, мабуть, додає амінокислотам дільниці 157-264 деякі специфічні зв'язуючі властивості, асоційовані з чинником RelA.

З точки зору описаних вище спостережень передбачається наступне:

(а) за винятком RelA, зв'язування RAP-2 з RIP, клоном №10 і, що найбільш ймовірно, з NIK і TIP60 не є обов'язковим для функціонування даного білка в якості інгібітору надекспресії, що індукується чинником NF-KB;

(б) вплив RAP-2 на індуквану надекспресію RelA активацію, ймовірно, принаймні частково, зумовлюється відмінними подіями зв'язування. По суті всі згадані вище білки можуть визначатися як чинники даної активності, на що вказують дані експериментів, проведених до теперішнього часу.

Завдяки унікальній здатності FAS-R і рецепторів TNF зумовлювати загибель клітин, рівно як і здібності рецепторів TNF опосередковувати різні тканино-ушкоджуючі ефекти, порушення функцій цих рецепторів може бути шкідливим для організму. Дійсно, і надмірна, і недостатня функція таких рецепторів, як було встановлено, зумовлює патологічні вияви при різних захворюваннях. Ідентифікація молекул, які беруть участь в сигнальних шляхах цих рецепторів, і виявлення механізмів модулювання функцій цих молекул представляє можливий ключ до нових терапевтичних прийомів відносно таких захворювань. З точки зору передбачуваної важливої ролі RIP у вияві токсичності рецепторами FAS-R і p55-R і, отже, важливої регуляторної ролі RAP-2 рецепторів FAS-R і p55-R через модуляцію RIP, представляється важливим створити лікарські засоби, які б могли блокувати цитотоксичні функції RIP, можливо, за рахунок блокування зв'язування RAP-2 з RIP або придушення будь-яким іншим шляхом взаємодії між RAP-2 і RIP при тих умовах, при яких RAP-2 виступає як підсилювач RIP-опосередкованої цитотоксичності (як відзначалося вище, RIP є цитотоксичним сам по собі і в поєднанні з іншими білками, в послідовності яких є «згубні домени»).

Подібним же чином відомо (див. вище), що рецептори FAS-R і p55-R залучені до активації транскрипційного чинника NF-KB і таким чином в забезпечення життєздатності (виживання) клітин. Отже, коли бажаним є знищення клітин, наприклад, пухлинних клітин, ВІЛ-інфікованих клітин і подібного, то бажаним має бути посилення цитотоксичної дії FAS-R і p55-R (і асоційованих з ними білків, таких, як, наприклад, MORT-1, MACH, Mch4, G1, TRADD), в той же час пов'язаний з придушенням їх здатність індукувати NF-KB. Отже, коли взаємодія або зв'язування RAP-2 з RIP зумовлює сприяння вірогідної функції RIP в посиленні індукції NF-KB (можливо, через білок TRAF2 і, мабуть, через кіназний домен і/або проміжну домен білка RIP), то бажаним

може бути блокування такої взаємодії між RAP-2 і RIP з метою придушення або, принаймні, для запобігання сприянню активації NF- $\kappa$ B, таким чином домагаючись зсуву в баланс ефектів, що індукуються TNF або лігандом FAS у бік вияву цитотоксичності, які зрештою приводили б до загибелі клітин.

Схожим чином при протилежній ситуації (по відношенню до описаного вище), коли зв'язування RAP-2 з RIP реально зумовлює придушення запальних або цитотоксичних ефектів FAS-R і p53-R і коли бажаним є заблокувати їх цитотоксичну дію, наприклад, при запаленнях, різних аутоімунних захворюваннях і при подібному, при яких потрібна підвищена життєздатність клітин, то важливим є створення лікарських засобів, які б посилювали взаємодію між RAP-2 і RIP з метою посилення загального рівня придушення загибелі клітин і зсуву в баланс у бік виживання клітин. Також ясно, в світлі сказаного вище, що при тому, що взаємодія RAP-2 з RIP зумовлює придушення функцій RIP відносно активації NF- $\kappa$ B, то, коли бажаним є збереження життєздатності клітин, необхідним є блокування даної взаємодії між RAP-2 і RIP, що таким чином посилює активність RIP щодо сприянню активації NF- $\kappa$ B.

У зв'язку з всім сказаним вище, можна заключити, що RIP характеризується ключовою роллю в підтримці балансу між індукцією і опосередковуваним механізмом запалення, загибелі клітин або виживання клітин: отже, RAP-2 відіграє аналогічно важливу роль, будучи модулятором білка RIP. Вплив на взаємодію/зв'язування RAP-2/RIP з використанням різних лікарських засобів або прийомів відповідно до того, що описується вище і далі забезпечить можливість зсуву у внутрішньоклітинних сигнальних механізмах від загибелі клітин до виживання клітин, і навпаки, якщо це представляється бажаним.

Також даний винахід стосується послідовності ДНК, що кодує білок RAP-2, а також білків RAP-2, що кодуються такими послідовностями ДНК.

Більш того даний винахід додатково стосується послідовностей ДНК, що кодують біологічно активні аналоги, фрагменти і похідні білка RAP-2, а також самі аналоги, фрагменти і похідні, що ними кодуються. Отримання таких аналогів, фрагментів і похідних здійснюється стандартними методами [див., наприклад, керівництво Sambrook et al., 1989], в яких в послідовності ДНК, що кодує білок RAP-2, один або більше число кодонів можуть бути делеговані, додані або замінені іншими з отриманням аналогів, що характеризуються принаймні заміною одного амінокислотного залишку в порівнянні з нативним білком.

Серед названих вище послідовностей ДНК за даним винаходом, які кодують білок RAP-2, його ізоформу, аналог, фрагмент або похідне, також, як варіант даного винаходу, включаються послідовності ДНК, здатні гібридизуватися з послідовністю кДНК, похідною від кодуючого сегмента нативного гену білка RAP-2, при тому, що таку гібридизацію проводять в умовах середньої міри жорсткості, а гібридизовані послідовності ДНК кодують біологічно активний білок RAP-2. Такі гібридизовані послідовності ДНК, отже, включають послідовності ДНК, які характеризуються відносно високим рівнем гомології з нативною послідовністю кДНК RAP-2, а раз так, то являють собою RAP2-подібні послідовності, які можуть бути, наприклад, природно похідними послідовностями, що кодують різні ізоформи RAP-2, або нативними послідовностями, що кодують білки, що відносяться до групи RAP2-подібних послідовностей, що кодують білок, що має активність білка RAP-2. Крім того, ці послідовності можуть включати, наприклад, ненативні синтезовані штучним шляхом послідовності, які схожі з нативною послідовністю кДНК RAP-2, але при цьому включають ряд бажаних модифікацій. Такі синтетичні послідовності, отже, включають всі можливі послідовності, що кодують аналоги, фрагменти і похідну RAP-2, при тому, що всі вони мають активність білка RAP-2.

Для отримання різних вищезазначених RAP2-подібних послідовностей, що природно зустрічаються стандартні процедури скрінінгу і виділення нативних зразків ДНК або РНК з різних тканин можуть бути застосовані з використанням нативної кДНК RAP-2 або її фрагментів як зондів [див. приклади стандартних процедур, описаних у Sambrook et al., 1989].

Таким же чином для отримання згадуваних вище різних синтетичних RAP2-подібних послідовностей, що кодують аналоги, фрагменти або похідну RAP-2 ряд стандартних методів може бути використаний у відповідності з детально описаним тут нижче з метою отримання таких аналогів, фрагментів і похідних.

Поліпептид або білок, який «в істотній мірі відповідає» білка RAP-2, включає не тільки сам білок RAP-2, але також і поліпептиди або білки, які є аналогами RAP-2.

Аналоги, які в істотній мірі відповідають білка RAP-2, є тими поліпептидами, в складі яких одна або більше число амінокислот нативної амінокислотної послідовності білка RAP-2 замінені на інші амінокислоти, делеговані і (або) додані, внаслідок чого білок, що виходить в результаті виявляє по суті таку ж або більш високу біологічну активність білка RAP-2, якому вони відповідають.

З метою досягнення істотної відповідності білка RAP-2 зміни в складі послідовності білків RAP-2, таких як його ізоформи, повинні бути, в принципі, невеликими. Хоч число таких змін може перевищувати десять, переважно, щоб таких змін було менш десяти, більш переважно - не більш п'яти, а найбільш переважно - не більш трьох таких змін. При тому, що будь-який метод може бути застосований для пошуку потенційно біологічно активних білків, які б відповідали білкам RAP-2, одним з таких методів є застосування стандартних прийомів мутагенезу у відношенні ДНК, що кодує даний білок, з отриманням внаслідок невеликих модифікацій. Ці білки, експресовані такими клонами, потім можуть бути піддані скрінінгу по їх здатності зв'язуватися з RIP і модулювати активність RIP відносно модулювання/опосередковування внутрішньоклітинних механізмів, що описувалися вище.

«Консервативними» замінами є такі зміни, які в зв'язку з очікуваними наслідками не приведуть до змін активності даного білка і які звичайно першими зазнають перевірки тому, що вони не зумовлюють істотних змін в розмірі/заряді або конфігурації даного білка, що, отже, як очікується, не призведе до зміни його біологічних властивостей.

Консервативні заміни білків RAP-2 включають аналог, при тому, що принаймні один амінокислотний залишок в складі поліпептиду був по консервативному типу замінений на відмінну амінокислоту. Такі заміни переважно виконують у відповідності з наступним переліком, показаним в таблиці ІА, при тому, що заміни можуть бути визначені в рутинних дослідках з метою забезпечення структурних і функціональних властивостей синтезованої поліпептидної молекули із збереженням тієї біологічної активності, яка характерна для білка

Таблиця ІА

Початковий залишок	Приклад заміни
аланін	гліцин, серин
аргінін	лізин
аспарагін	глутамін, гістидин
аспарагінова кислота	глутамінова кислота
цистеїн	серин
глутамін	аспарагін
глутамінова кислота	аспарагінова кислота
гліцин	аланін, пролін
гістидин	аспарагін, глутамін
ізолейцин	лейцин, валін
лейцин	ізолейцин, валін
лізин	аргінін, глутамін, глутамінова кислота
метіонін	лейцин, тирозин, ізолейцин
феніланін	метіонін, лейцин, тирозин
серин	треонін
треонін	серин
триптофан	тирозин
тирозин	триптофан, феніланін
валін	ізолейцин, лейцин

З іншого боку, інша група заміни в білці RAP-2 представлена тими замінами, внаслідок яких принаймні один амінокислотний залишок в даному поліпептиді віддається, а відмінний залишок вбудовується на його місце у відповідності з таблицею ІВ. Типи заміни, які можуть бути вироблені в складі даного поліпептиду, можуть бути засновані на аналізі частот амінокислотних заміни при порівнянні гомологічних білків у різних видів, таких, як ті, які показані в таблиці 1-2 у G.E.Schulz et al, 1978, «Principles of Protein Structure», Springer-Verlag, New York, NY і на Fig.3-9 у T.E.Creighton, 1983, «Proteins: Structure and Molecular Properties», W.H.Freeman & Co., San Francisco, CA. Засновуючись на подібному аналізі, альтернативні консервативні заміни визначені тут як заміни в межах однієї з 5 груп.

Таблиця ІВ

1.	Невеликі аліфатичні, неполярні або слабополярні залишки: аланін, серин, треонін (пролін, гліцин)
2.	Полярні, негативно заряджені залишки і їх амідні: аспарагін, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, глутамін
3.	Полярні, позитивно заряджені залишки: гістидин, аргінін, лізин
4.	Великі аліфатичні неполярні залишки: метіонін, лейцин, ізолейцин, валін (цистеїн)
5.	Великі ароматичні залишки: феніланін, тирозин, триптофан

Три амінокислотних залишки, укладені в приведеній вище таблиці в дужки, грають специфічну роль в архітектурі білка. Гліцин є єдиним залишком, що не має бічного ланцюга і тому забезпечує гнучкість ланцюжку. Це, однак, зумовлює тенденцію утворення іншої вторинної структури, ніж  $\alpha$ -спіральної. Пролін, завдяки своїй незвичайній геометрії, значно ущільнює ланцюжок, зумовлюючи тенденцію утворення структур типу  $\beta$ -вигинів, хоч в деяких випадках цистеїн може бути здатним брати участь в формуванні дисульфідних зв'язків, які грають важливу роль в укладанні і підтримці просторової структури білка (в його «фолдинзі»). Треба відзначити, що в публікації, що цитувалася вище Schuiz et al. приведені вище групи 1 і 2 об'єднані. Також треба помітити, що тирозин за рахунок його здатності утворювати водневі зв'язки характеризується істотною схожістю з серином і треоніном, і т.д.

Консервативні амінокислотні заміни відповідно до даного винаходу, наприклад, так, як зазначалося вище, відомі в даній області техніки, тому можна чекати, що будуть збережені біологічні і структурні властивості даного поліпептиду після такої амінокислотної заміни. Більшість делецій або заміни відповідно до даного винаходу є такими, які не приводять до різких змін в параметрах даного білка або поліпептидної молекули. Ці «параметри» визначаються таким чином, щоб врахувати і зміни у повторній структурі, наприклад, таких як  $\alpha$ -спіралі або в площини, і зміна в біологічній активності, наприклад, в скріпленні з RIP і (або) опосередкуванні впливу RIP на загибель клітин.

Прикладами вироблення амінокислотних заміни в білках, які можуть бути використані для отримання аналогів білків RAP-2 з метою їх використання відповідно до даного винаходу, включають будь-які відомі методи, такі як представлені [в патентах США №№ RE-33653, 4959314, 4588585 і 4737462, видані Merk et al., 5116943, виданий Koths et al., 4965195, виданий Namen et al., 4879111, виданий Chong et al., і 5017691, виданий Lee et al.; а також замінені по лізину білки, представлені патентом США №4904584 (виданий Shaw et al.).

Крім консервативних заміни, що обговорювалися вище, які в істотній мірі не змінюють активності білка RAP-2, також або консервативні заміни, або менш консервативні і в більшій мірі випадкові заміни, які приводять до

посилення біологічної активності аналогів білків RAP-2, входять в масштаб даного винаходу.

Після того, як точний ефект заміни або делеції підтверджений, фахівцям в даній області техніки має бути зрозумілим, що такий ефект заміни (замін), делеції (делецій) і т.п. повинен бути оцінений із застосуванням рутинних тестів на зв'язування і загибель клітин. Скрінінг на основі стандартного тесту не будуть включати будь-яких незапланованих додаткових експериментів.

Прийнятними аналогами RAP-2 є такі аналоги, які зберігають принаймні здатність зв'язуватися з RIP, таким чином, як відзначалося вище, опосередковуючи активність RIP відносно внутрішньоклітинних механізмів, що описувалися вище. У цьому значенні можуть бути отримані аналоги, які будуть мати т.з. «домінантно-негативним виявом», а саме такий аналог буде дефектним або по скріпленню з RIP, або по подальшому виробленню сигналу, або по будь-якій іншій активності, що є наслідком такого зв'язування. Такі аналоги можуть бути використані наприклад, для придушення виявів RIP або для придушення індукції NF-KB (прямої або опосередкованої), що зумовлюється RIP, що залежить від того, яка з цієї активності є основною з опосередкованих взаємодією RAP-2 і RIP (див. вище), що буде зумовлюватися такими аналогами за рахунок їх конкуренції з нативним RAP-2 за зв'язування з RIP.

На генетичному рівні такі аналоги звичайно отримують із застосуванням методу направленного мутагенезу у відношенні нуклеотидів в складі ДНК, що кодує білок RAP-2, таким чином утворюючи ДНК, яка кодує аналог, після чого синтезують таку ДНК і експресують поліпептид в рекомбінантній клітинній культурі. Звичайно такі аналоги виявляють таку ж або підвищену біологічну активність в порівнянні з нативним білком: Ausubel et al., 1987/1995, «Current Protocols in Molecular Biology» Greene Publ. & Wiley Intersci., New York, NY; Sambrook et al., 1989, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Отримання білка RAP-2 відповідно до викладеного тут або альтернативної нуклеотидної послідовності, що кодує такий же поліпептид, але відмінної від нативної послідовності через зміни, що визначаються відомою виведеністю генетичного коду, може бути здійснено із застосуванням методу направленного (сайт-специфічного) мутагенезу тієї ДНК, яка кодує раніше отриманий аналог або нативний варіант білка RAP-2. Метод направленного мутагенезу дозволяє отримувати аналоги шляхом використання специфічних олігонуклеотидних послідовностей, які кодують послідовність ДНК, що включає бажану мутацію, рівно як і достатня кількість сусідніх з нею нуклеотидів, з метою отримання послідовності затравка необхідної довжини і складу для отримання стабільного дуплексу по обидві сторони від делеційного стику, що є. Звичайно переважними є затравки, що складаються приблизно з 20-25 нуклеотидів, при тому, що по 5-10 комплементарних нуклеотидів на кожній стороні послідовності змінені. Загалом, метод направленного мутагенезу добре відомий в науці, прикладом чому може служити [публікація Adelman et al., 1983, DNA, 2, 183], зміст якої включений тут для зведення у вигляді бібліографічного посилання.

Як має бути зрозумілим, метод направленного мутагенезу звичайно заснований на використанні фагового вектору, який існує і в одноланцюговій, і в дволанцюговій формах. Звичайними векторами, що застосовуються в методі направленного мутагенезу, є такі вектори, як фаз M13, наприклад, відповідно до викладеного [y Messing et al., 1981, In «3d Cleveland Symp. Macromolecules & Recombinant DNA», ed. A.Walton, Elsevier, Amsterdam], зміст якої включений тут для зведення у вигляді бібліографічного посилання. Цей фаз легко доступний на комерційній основі і його використання, в принципі, добре відомо фахівцям в даній області техніки. З іншого боку, плазмідні вектори, які включають одноланцюговий сайт початку реплікації (Veira et al., 1987, Meth. Enzymol., 153, 3), можуть бути використані для отримання одноланцюгової ДНК.

Загалом, метод направленного мутагенезу в зв'язку з тим, що описується в даному тексті здійснюють спочатку шляхом отримання одноланцюгового вектору, який включає в своїй послідовності послідовність ДНК, яка кодує шуканий поліпептид. Олігонуклеотидну затравку, несучу бажаним чином мутувавши послідовність, отримують синтетичним шляхом за допомогою автоматичного полінуклеотидного синтезу. Потім цю затравку випалюють на одноланцюговий вектор, що включає кодуючу білок послідовність, і обробляють ферментами з ДНК-полімеразною активністю, такими як фрагмент Кленова ДНК-полімерази I E.coli, з метою завершення синтезу ланцюга, що включає мутацію. Таким чином, мутантна послідовність і другий ланцюг несуть бажану мутацію. Такий гетеродуплексний вектор потім використовують для трансформації відповідних клітин, таких як клітини E.coli штамма JM101, а після цього відбирають ті клони, які несуть рекомбінантні вектори, що включають бажану мутантну послідовність.

Після відбору такого клону мутантну послідовність білка RAP-2 може бути виділена і вбудована до складу відповідного вектора - звичайно трансферного або експресуючого вектора такого типу, який може бути використаний для трансфекції відповідного організму-господаря.

Таким чином, ген або нуклеїнова кислота, що кодує білок RAP-2, також може бути детектовано, отримано і (або) модифіковано *in vitro*, *in situ* і (або) *in vivo* із застосуванням відомих методів ампліфікації ДНК або РНК, таких як ПЛР і хімічний синтез олігонуклеотидів. ПЛР забезпечує ампліфікацію (збільшення в кількості) конкретних послідовностей ДНК за рахунок реакцій полімеризації ДНК, що повторюються. Ця реакція може бути використана замість клонування єдине що для цього потрібно, це встановлення нуклеотидної послідовності. З метою здійснення ПЛР затравки конструюють таким чином, щоб вони були комплементарні представляючій інтерес послідовності. Потім затравки отримують шляхом автоматичного синтезу ДНК. Оскільки затравки можуть бути встроєні таким чином, щоб гібридизувати з будь-якою ділянкою даного гену, то можуть бути вибрані такі умови, що можуть виникати помилки при спаровуванні комплементарних основ. Ампліфікація цих помилкових ділянок може призводити до синтезу мутантного продукту, внаслідок чого буде утворюватися пептид, що характеризується новими властивостями (тобто це і буде направлений мутагенез): див. також, наприклад, Ausubel, цит. вище, розділ 16. Також шляхом сполучного синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з використанням зворотної транскриптази в ПЛР як початковий матеріал може бути використана РНК для цілої синтезу внутрішньоклітинного домену рецептора пролактину без клонування.

Більш того ПЛР-затравки можуть бути сконструйовані таким чином, щоб включати нові рестрикційні сайти або інші елементи, такі як стоп-кодони, по кінцях генного сегменту, який буде ампліфікуватися. Таке внесення рестрикційних сайтів по 5'- і 3'-кінцям ампліфікованої генної послідовності забезпечить генному сегменту, що

кодує білок RAP-2 або його фрагмент, можливість лігування на інші послідовності і (або) по сайтах клонування в складі векторів.

ПЛР і інші методи ампліфікації РНК і (або) ДНК добре відомі в науці і можуть бути використані відповідно до даного винаходу без додаткових експериментів, заснованих на представлений тут інформації. Відомі методи ампліфікації ДНК і РНК включають, таким чином не обмежуючись, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) і схожі ампліфікаційні процеси [див., наприклад, патенти США W 4683195, 4683202, 4800159, 4965188, видані Mullis et al., 4795699 і 4921794, видані Tabor et al., 5142033, виданий Innis, 5122464, виданий Wilson et al., 5091310, виданий Innis, 5066584, виданий Gyllenstein et al., 4889818, виданий Gelfand et al., 4994370, виданий Silver et al., 4766067, виданий Biswas, 4656134, виданий Ringold, а також Innis et al., (eds.), «PCR Protocols: A Guide to Method and Applications»] і опосередковану РНК ампліфікацію, в якій матриця використовується РНК, що є протисмисловою по відношенню послідовності-мішені, для цілей синтезу двохланцюгової ДНК [патент США №5130238, виданий Maiek et al.: торгова марка способу NASBA], і імунно-ПЛР, в якій поєднується використання ампліфікації ДНК з поміченням антитіл (Ruzicka et al., 1993, Science, 260, 487; Sano et al., 1992, Science, 258, 120; Sano et al., 1991, Biotechniques, 9, 1378), при тому, що повний зміст цих патентів і наукових публікацій включений тут для зведення у вигляді бібліографічних посилань.

Аналогічним чином біологічно активні фрагменти білків RAP-2 (наприклад, будь-яких RAP-2 або його ізоформ) можуть бути отримані відповідно до описаного вище відносно аналогів білків RAP-2. Відповідними фрагментами білків RAP-2 є ті фрагменти, які зберігають активність RAP-2 і які можуть модулювати або опосередковувати біологічну активність RIP або інших білків, що асоціюються з RIP напряму або непрямо. Відповідно, можуть бути отримані такі фрагменти білків RAP-2, які будуть виявляти домінантно-негативний або домінантно-позитивний ефект так само, як було відмічено вище для аналогів. Необхідно зазначити, що ці фрагменти представляють окремий клас аналогів за даним винаходом, а саме вони визначаються як ділянки білків RAP-2, похідні від повної розмірної послідовності білка RAP-2 (наприклад, послідовності будь-якого RAP-2 або їх ізоформ), при тому, що кожна ділянка або фрагмент має будь-яку з описаних вище активність. Такий фрагмент може бути, наприклад, пептидом.

Схожим чином похідні можуть бути отримані за допомогою стандартних модифікацій бічних ланцюгів одного або більшого числа амінокислотних залишків в складі білка RAP-2, його аналогів або фрагментів або шляхом з'єднання білка RAP-2, його аналогів або фрагментів з іншою молекулою, наприклад, антитілом, ферментом, рецептором і т.п., що добре відомо в даній області техніки. Відповідно, по використанню в даному тексті термін «похідні» охоплює похідні, які можуть бути отримані на основі функціональних груп, які є в складі бічних ланцюгів залишків, що знаходяться на N- або C-кінцях, із застосуванням відомих в науці методів, і ці похідні також попадають в об'єм даного винаходу. Похідні можуть бути хімічними складовими, такими як залишки вуглеводів і фосфатів, утворюючи фракцію, яка буде мати таку ж або більш високу біологічну активність в порівнянні з білками RAP-2.

Наприклад, похідні можуть включати аліфатичні ефір карбоксильних груп, амід карбоксильних груп за рахунок реакції з амонієюною групою з первинними або повторними амінами, N-ацильні похідні або вільні аміногрупи амінокислотних залишків, утворюваних ацильними складовими (наприклад, алканольними або карбоциклоарильними групами), або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, у залишків серину або треоніну), що утворюються ацильними складовими.

Термін «похідні» покликаний включити тільки ті похідні, в яких не відбувається заміни однієї амінокислоти на іншу амінокислоту в межах двадцяти амінокислот, що зустрічаються в природних умовах.

RAP-2 є білком або поліпептидом, наприклад, послідовністю, складеною залишками амінокислот. Поліпептид, що включає більш великі послідовності, якими є повна послідовність білка RAP-2 відповідно до даних тут визначень, попадає в об'єм даного винаходу, якщо довжина такого поліпептиду за рахунок вставок, що є не зумовлює порушення основних і нових параметрів за даним винаходом, тобто якщо він або зберігає, або посилює біологічну активність білка RAP-2, або ж він може бути розщеплений з утворенням білка або поліпептиду, що має біологічну активність білка RAP-2. Таким чином, наприклад, даний винахід представляє химерні білки, що включають білок RAP-2 і інші амінокислоти або пептиди.

Новий білок RAP-2, його аналоги, фрагменти і похідні можуть характеризуватися рядом шляхів використання, наприклад:

(1) білок RAP-2, його аналоги, фрагменти і похідні можуть бути використані для модулювання функцій білка RIP відносно механізмів або запалень, або загибелі клітин, або виживання клітин відповідно до описаного вище. Наприклад, якщо RAP-2 може модулювати вплив RIP на активацію транскрипційного чинника NF-KB, JNK (кінази Jun) і кінази p38, то такі ефекти RAP-2 будуть призводити до посилення такої взаємодії RAP-2/RIP, коли бажаним буде використати це в протипухлинних, проти- і прозапальних цілях, проти ВІЛ-інфекцій і т.п. У цьому разі білок RAP-2, його аналоги, фрагменти або похідні, які здатні модулювати запалення, посилювати цитотоксичність або блокувати ефект по підтримці життєздатності клітин, можуть бути внесені в клітини за допомогою відомих стандартних прийомів. Наприклад, коли білок RAP-2 є внутрішньоклітинним (як передбачається) і повинен бути внесений тільки всередину тих клітин, на які через RIP впливають FAS-ліганд або TNF, або інші цитотоксичні білки, то необхідно використати систему специфічного внесення такого білка в такі клітини. Одним з шляхів вирішення цієї проблеми є створення рекомбінантного вірусу тварини, наприклад, похідного від вірусу коров'ячої віспи, до ДНК якого повинні бути приєднані два наступних гени: ген, що кодує ліганд, який зв'язується поверхово-клітинними білками, специфічно експресованих цими клітинами, наприклад, такий як білок gp120 вірусу імунodefіциту людини (ВІЛ), який специфічно зв'язується на деяких клітинах (CD4-позитивні лімфоцити і родинний лейкоз), або будь-який інший ліганд, який специфічно зв'язується з клітинами, несучими рецептори FAS-R або p55-R, внаслідок чого рекомбінантний вірусний вектор буде здатний зв'язуватися на таких клітинах, несучих рецептори FAS-R або p55-R; і ген, що кодує білок RAP-2. Таким чином, експресія білка, що зв'язується на клітинній поверхні забезпечить вірусу специфічність відносно пухлинної клітини або іншої клітини, несучої рецептори FAS-R або p55-R, як мішені, після чого послідовність, що кодує білок RAP-2, буде внесена в клітини за допомогою даного

вірусу, а після експресії в цих клітинах станеться посилення опосередкованого білком RIP впливу ліганду FAS-R або TNF або незалежного від RIP такого впливу. Конструювання такого рекомбінантного вірусу тварин засновується на стандартних процедурах (див., наприклад, Sambrook et al., 1989). Інша можливість заснована на внесенні послідовностей білка RAP-2 (наприклад, будь-якого білка RAP-2 або їх ізоформ) в форми олігонуклеотидів, які можуть бути адсорбовані цими клітинами з подальшою їх експресією всередині них.

(2) Вони можуть бути використані для придушення впливу ліганду FAS-R, TNF або родинного білка, опосередкованого білком RIP або незалежного від RIP їх впливу, наприклад, у разях пошкодження тканин при септичному шоці, відторгненні тканин при реакції «трансплантат проти господаря» або гострому гепатиті, при яких бажаним є блокування лігандом FAS-R, що індукуються або TNF сигналів через рецептори FAS-R або p55-R, або їх незалежного від RIP впливу, або опосередкованого іншими білками впливу при одночасному посиленні механізму виживання клітин. У такій ситуації можливим є, наприклад, внесення в клітини за допомогою стандартних процедур олігонуклеотидів, що включають проти смислові кодуєчі послідовності білка RAP-2, які б ефективно заблокували трансляцію мРНК, що кодує білок RAP-2, таким чином блокуючи його експресію і приводячи до придушення впливу ліганду FAS-R, TNF, RIP або інших білків. Такі олігонуклеотиди можуть бути внесені в клітини з використанням описаного вище підходу, заснованого на рекомбінантних вірусах, при тому, що другою послідовністю, що включається в такий вірус, є дана олігонуклеотидна послідовність.

Подібно описаному вище чином, в залежності від природи взаємодії між RAP-2 і RIP, із застосуванням описаних вище підходів (1) і (2) можливим може бути посилити або подавити клітинні механізми запалення і виживання, якщо це є бажаним.

Інша можливість визначається використанням антитіл, специфічних відносно білка RAP-2, з метою придушення його внутрішньоклітинної сигнальної активності.

Ще одним шляхом придушення RIP-опосередкованих виявів або незалежних від RIP ефектів є застосування недавно відкритого рибозимного підходу. Рибозими - це каталітично активні молекули РНК, які специфічно розщеплюють інші РНК. Рибозими можуть бути вибудовані штучно так, щоб розщеплювати РНК-мішені на вибір, наприклад, мРНК, що кодує білок RAP-2 за даним винаходом. Такі рибозими повинні характеризуватися послідовністю, специфічною відносно мРНК білка RAP-2, і повинні бути здатні взаємодіяти з нею (шляхом комплементарного зв'язування) з подальшим розщепленням цієї мРНК, внаслідок чого буде меншати (або повністю втрачатися) експресія білка RAP-2, при тому, що міра такого зменшення експресії буде залежати від рівня експресії рибозиму в клітині-мішені. Для внесення рибозимів у вибрані клітини (наприклад, клітини, несучі рецептори FAS-R або p55-R) може бути використаний будь-який відповідний вектор, наприклад, плазміда, вектори на основі вірусів тваринних (ретровірусів), які звичайно використовуються для цих цілей (див. також описаний вище п. (1), в якому вірус як друга послідовність буде включати КДНК, що кодує дану вибрану рибозимну послідовність). (Як огляди, що описують рибозимні методи, див. Chen et al., 1992; Zhao & Pick, 1993; Shore et al., 1993; Joseph & Burke, 1993; Shimayama et al., 1993; Cantor et al., 1993; Barinaga, 1993; Crisell et al., 1993; Koizumi et al., 1993). Такий підхід застосують тоді, коли взаємодія RAP-2/RIP посилює цитотоксичність в ситуаціях, коли бажаним є заблокувати цю цитотоксичність, або коли взаємодія RAP-2/RIP придушує активацію NF-KB в такій же ситуації бажаності блокування такого придушення з метою інтенсифікації активації NF-KB, тобто в обох випадках бажаним є підвищення виживання клітин, як це описувалося в п.(2).

(3) Білок RAP-2, його аналоги, фрагменти або похідні також можуть бути використані для цілей виділення, ідентифікації і клонування інших білків того ж самого класу, тобто тих білків, які зв'язуються з білком RIP або на функціонально родинних рецепторах або білках, що беруть участь у внутрішньоклітинних сигнальних механізмах. У такому застосуванні може бути використана згадувана вище двогібридна дріжджева система, або може бути використана недавно розроблена система, заснована на нежорстких умовах Саузерн-блот-гібридизації з подальшим ПЛР-клонуванням (Wilks et al., 1989). В публікації Уїлкса з співавт. описується ідентифікація і клонування двох передбачуваних тирозинкіназ із застосуванням нежорсткої гібридизації по Саузерну з подальшим клонуванням на базі ПЛР, заснованих на відомій послідовності кіназного мотиву - тобто «заданої кіназної послідовності». Такий підхід може бути використаний відповідно до даного винаходу з використанням послідовності білка RAP-2 з метою ідентифікації і клонування родинних білків, RIP-зв'язуючихся.

(4) Ще один підхід до використання білка RAP-2 або його аналогів, фрагментів або похідних за даним винаходом пов'язаний з їх використанням в методах афінної хроматографії, націлених на виділення і ідентифікацію інших білків або чинників, з якими вони здатні зв'язуватися, наприклад, інших білків або чинників, залучених у внутрішньоклітинні сигнальні механізми. У такому застосуванні білок RAP-2, його аналоги, фрагменти або похідні за даним винаходом можуть бути окремо приєднані до матриць для афінної хроматографії і потім проконтакттовані з клітинними екстрактами або ізольованими білками або чинниками, які, як припускається, залучені до внутрішньоклітинних сигнальних механізмів. По завершенні процедури афінної хроматографії інші білки або чинники, які зв'язуються з білком RAP-2 або з його аналогами, фрагментами або похідними за даним винаходом, можуть бути елюйовані, виділені і охарактеризовані.

(5) Як відзначалося вище, білок RAP-2, його аналоги, фрагменти або похідні за даним винаходом також можуть бути використані в якості імуногенів (антигенів) для цілей отримання специфічних відносно них антитіл. Такі антитіла можуть бути використані для цілей очищення білка RAP-2 (наприклад самого RAP-2 або його ізоформ) або з клітинних екстрактів, або з трансформованих клітинних ліній, що виробляють білок RAP-2 або його аналоги або фрагменти. Далі, ці антитіла можуть бути використані для діагностичних цілей в ідентифікації захворювань, пов'язаних з аномальним функціонуванням RIP-опосередкованих систем ліганду FAS-R або TNF незалежних від RIP активності, наприклад, знижених або підвищених клітинних ефектів, що індукуються лігандом FAS-R або TNF, опосередкованих білком RIP або власного впливу RIP на клітини. Таким чином, якщо такі захворювання пов'язані з порушеннями функціонування внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що залучають білок RIP або різні інші згадувані білки, що вище RIP-зв'язуються або власне білок RAP-

2, то такі антитіла будуть служити як ефективний діагностичний засіб.

Необхідно також зазначити, що виділення, ідентифікація і охарактеризування білка RAP-2 за даним винаходом можуть бути здійснені з використанням будь-кого з відомих в даній області техніки стандартних процедур. Наприклад, одна з таких процедур скрінінгу, а саме процедура на основі двохгібридної дріжджової системи, детально описана нижче, була використана для ідентифікації білка RIP (див. Stanger et al., 1995) і потім - різних білків RAP-2 за даним винаходом (крім ряду інших нових білків, що заявляються що згадуються тут вище і далі тематично пов'язаними патентними заявками). Також, як це описувалося вище і буде розглянуто далі, інші процедури, такі як афінна хроматографія, методи гібридизації ДНК і т.п., добре відома в даній області техніки, можуть бути застосовані для виділення, ідентифікації і охарактеризування білка RAP-2 за даним винаходом або для виділення, ідентифікації і охарактеризування додаткових білків, чинників, рецепторів і т.п., які здатні зв'язуватися з білками RAP-2 за даним винаходом.

Як зазначалось в даному тексті вище, білок RAP-2 може бути використаний для отримання антитіл, специфічних відносно білків RAP-2, наприклад, самого RAP-2 і його ізоформ. Такі антитіла або їх фрагменти можуть бути використані у відповідності з детально описаним тут далі, і має бути зрозумілим, що в таких застосуваннях антитіла або їх фрагменти - ті, що специфічні відносно білків RAP-2.

Засновуючись на інформації, отриманій відповідно до даного винаходу про те, що RAP-2 специфічно зв'язується з RIP і внаслідок цього є медіатором/модулятором RIP, а, отже, може опосередковувати/модулювати активність білка RIP відносно механізмів запалень, загибелі клітин або виживання клітин, при тому, що RIP функціонує сам по собі або у взаємодії з іншими білками (наприклад, FAS-R, p55-R, MORT-1, MACI, Mch4, G1 і TRADD в механізмах загибелі клітин або з TRAF2 в механізмах виживання клітин), важливим є створення лікарських засобів, які можуть посилювати або придушувати взаємодію RAP-2/RIP відповідно до бажаного, в залежності від того, які з цих механізмів посилюються/придушують взаємодією RAP-2/RIP. Відомо багато захворювань, при яких такі ліки можуть надати істотну допомогу. Серед інших захворювань це гострий гепатит, при якому гострі поразки тканини печінки, як представляється, відображають загибель печінкових клітин/ опосередковану лігандом рецептору FAS-R; індукована аутоімунітетом загибель клітин, така як загибель  $\beta$ -клітин острівців Лангергансу в підшлунковій залозі, як чинник діабету; загибель клітин при відторгненні трансплантатів (наприклад, що пересаджуваних нирок, серця і печінки); загибель олігодендроцитів в головному мозку при розсіяному склерозі; і придушувана СНІДом, Т-клітинна суїцидальність, яка зумовлює відтворення вірусу СНІД, а, отже, і сам синдром надбаного імунodefіциту.

Можливо, що білок RAP-2 або одна або декілька його ізоформ можуть служити як «природні» інгібітори білку RIP в одному або декілька згадуваних вище механізмів, а це, отже, можна використати для специфічного придушення RIP, про яке йшлося вище. Таким же чином інші субстанції, такі як пептиди, органічні сполуки, антитіла і т.п., можуть бути піддані скрінінгу з метою отримання специфічних лікарських засобів, які б були здатні придушувати взаємодію RAP-2/RIP.

Не обмежуючи будь-яким чином приклад того, як пептидні інгібітори взаємодії RAP-2/RIP можуть бути сконструйовані і протестовані, заснований на проведених дослідженнях пептидних інгібіторів ICE або ICE-подібних протеаз, субстратної специфічності ICE і стратегій аналізу епітопів з використанням методів пептидного синтезу. Мінімально необхідний для ефективного розщеплення пептиду під дією протеази ICE було знаходження в ньому чотирьох амінокислот від сайту такого розщеплення при жорсткій перевазі залишку аспарагінової кислоти в положенні P1 і при достатності наявності метиламіну праворуч від сайту P1 (Sleath et al., 1990; Howard et al., 1991; Thornberry et al., 1992). Більш того флуорогенний пептидний субстрат, що є тетрапептидом, - ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-метилкумарил-7-амід), що скорочено позначається як Ac-DEVD-AMC, - відповідає послідовності полі-АДФ-рибозополімерази (ПРАП), розщеплення якої виявляється в клітинах незабаром після стимуляції рецептора FAS-R нарівні з іншими процесами апоптозу (Kaufmann, 1989; Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994), при тому, що це розщеплення ефективно здійснюється з участю CPP32 (представник родини протеаз CED3/ICE) і протеаз MACH (а також, мабуть, і протеаз G1 - див., наприклад, тематично пов'язану ізраїльську патентну заявку IL 120367).

З урахуванням того, що положення P1 має бути зайнято залишком аспарагінової кислоти, тетрапептиди, що включають в 4-м положенні аспарагінову кислоту і різні поєднання амінокислот в перших трьох положеннях, можуть бути піддані оперативному тестуванню на зв'язування з активним сайтом протеаз із застосуванням, наприклад, методу, розробленого Гейзенем [Geysen, 1985; Geysen et al., 1987], в якому велике число пептидів на твердих підкладках аналізують за специфічними взаємодіями з антитілами. Зв'язування протеаз MACH зі специфічними пептидами може бути виявлене за допомогою різних методів, добре відомих фахівцям в даній області техніки, таких як радіоактивне помічення протеаз G1 і т.п. В даному методі Гейзена, як було показано, можливе протестувати принаймні 4 тисячі пептидів за один робочий день.

Схожим чином точно положення дільниці зв'язування або дільниці гомології, яка визначає взаємодію між RAP-2 і RIP, може бути встановлено, після чого ці пептиди можуть бути протестовані на потенційне блокування такої взаємодії, наприклад, пептиди, які синтезовані таким чином, щоб їх послідовність характеризувалася схожістю з дільницею зв'язування або була йому комплементарна, так, щоб забезпечити конкуренцію нативному RAP-2 по скріпленню з білком RIP.

Ліки або пептидні інгібітори, які здатні придушувати запальну активність або активність RAP-2 по загибелі клітин за рахунок придушення взаємодії між RAP-2 і RIP, можуть бути сполучені або включені до комплексів з молекулами, які полегшують проникнення всередину клітин.

[У патенті США №5149782] заявляється сполука молекули, яка призначена для перенесення через клітинну мембрану, з мембрано-проникаючим агентом, таким як фузогенні поліпептиди, поліпептиди, створюючі іонні канали, інші мембранні поліпептиди і жирні кислоти з довгими ланцюгами, наприклад, міристинова кислота і пальмітинова кислота. Ці мембрано-проникаючі агенти вносять молекулярний кон'югат в ліпідний бішар клітинних мембран і полегшують таким чином його попадання до цитоплазми.

[У патенті США №5108921, виданому Low et al.,] узагальнені доступні способи трансмембранної доставки



молекул, таких як, таким чином не вичерпуючись, білки і нуклеїнові кислоти, по механізмі опосередкованого рецепторами ендоцитоза. Такі рецепторні системи включають рецептори, що розпізнають галактозу, маннозу, маннозо-6-фосфат, трансферин, асиалогликопротеїн, транскобаламін (вітамін B<sub>12</sub>), α<sub>2</sub>-макрोगлобуліни, інсулін і інші пептидні чинники зростання, такий як епідермальний чинник зростання (EGF). Авторами даного патенту вказується на те, що харчові рецептори, такі як рецептори біотину і фолатів, можуть бути переважно використані для інтенсифікації транспорту через клітинну мембрану, завдяки наявності і численності біотинових і фолатних рецепторів на поверхні плазмалемі більшості типів клітин і існуванням пов'язаних з цими рецепторами трансмембранних транспортних процесів. Таким чином, комплекс, утворений сполукою, яка призначена для доставки до цитоплазми, і лігандом, таким як біотин або фолат, контактують з клітинною мембраною, несучою біотинові або фолатні рецептори з метою ініціації опосередкованого цими рецепторами механізму трансмембранного перенесення, таким чином забезпечуючи проникнення бажаної сполуки всередину такої клітини.

Крім того, в науці відомо, що сполучення бажаної пептидної послідовності з лідером (сигнальним сегментом послідовності) з отриманням «химерного пептиду» зробить можливим транспортування такого «химерного пептиду» через клітинну мембрану з попаданням в цитоплазму.

Як має бути зрозумілим фахівцеві в даній області техніки, пептидні інгібітори взаємодії RAP-2/RIP відповідно до даного винаходу включають в себе ліки-пептидомиметики або інгібітори, які також можуть бути оперативно протестовані по їх скріпленню з протеазою RAP-2/RIP з метою отримання по можливості найбільш стабільних інгібіторів.

Також має бути зрозумілим, що аналогічний спосіб полегшення або підвищення ефективності перенесення пептидних інгібіторів через клітинні мембрани відповідно до того, що обговорювався вище, також може застосовуватись відносно самих білка RAP-2 або його ізоформ, рівно як і інших пептидів і білків, які виявляють свою дію всередині клітин.

Що стосується антитіл, що згадуються в даній заявці, то термін «антитіло» покликаний включити в себе поліклональні антитіла, моноклональні антитіла (MAT), химерні антитіла, антиідіотипіви антитіла до антитіл, які можуть бути помічені в розчинній або пов'язаній формі, рівно як і їх фрагменти, отримані із застосуванням будь-якого методу, такого як, не обмежуючись таким чином, каталітичного розщеплення, пептидного синтезу або рекомбінантних методологій.

Поліклональні антитіла являють собою гетерогенні популяції молекул імуноглобулінів, похідних від сироватки тварин, імунізованих антигеном. Моноклональне антитіло включає в істотній мірі гомогенну популяцію антигенних-специфічних антитіл, при тому, що ця популяція несе в істотній мірі схожі сайти зв'язування епітопа. Моноклональні антитіла можуть бути отримані із застосуванням методів, відомих фахівцям в даній області техніки: див., [наприклад, Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256, 495-497; патент США №4376110; Ausubel et al., цит. вище; Harlow & Lane (eds.), 1988, «Antibodies: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Colligan et al. (eds.), 1992-1996, «Current Protocols in Immunology», Greene Publ. Assoc. and Wiley Intersci., NY]; їх повний зміст включений тут для зведення у вигляді бібліографічних посилань. Такі антитіла можуть бути представлені імуноглобулінами будь-якого класу, включаючи IgG, IgM, IgE, IgG, GILD або будь-якого їх підкласу. Гібридома, що виробляє mAb за даним винаходом, може культивуватись *in vitro*, *in situ* або *in vivo*. Вироблення високих титрів mAb *in vivo* або *in situ* робить ці варіанти переважними способами їх отримання.

Химерні антитіла - це молекули, у яких різні сегменти є похідними від різних видів тваринних, такі як антитіла, що включають варіабельні домени, похідну від мишачих MAT, і константний домен імуноглобуліну людини. Химерні антитіла, насамперед, використовуються з метою зниження імуногенності у відповідь на їх застосування і з метою підвищення рівня їх вироблення, наприклад, тоді, коли мишачі MAT MAT-стантний домен імуноглобуліну людини. Химерні антитіла, насамперед, використовуються з метою зниження імуногенності у відповідь «мишачо-людські» моноклональні антитіла. Химерні антитіла і способи їх отримання відомі в науці [Cabilly et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3273-3277; Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6851-6855; Boulianne et al., 1984, *Nature*, 312, 643-646; Cabilly et al., європейська патентна заявка №125023, опублікована 14 листопада 1984р.; Neuberger et al., 1985, *Nature*, 314, 268-270; Taniguchi et al., європейська патентна заявка №171496, опублікована 19 лютого 1985р.; Morrison et al., європейська патентна заявка №173494, опублікована 5 березня 1986р.; Neuberger et al., патентна заявка PCT 184187, опублікована 13 березня 1986р.; Kudo et al., європейська патентна заявка №184187, опублікована 11 червня 1986р.; Sahagan et al., 1986, *J. Immunol*, 137, 1066-1074; Robinson et al., міжнародна патентна заявка №WO 87/02671, опублікована 7 травня 1987р.; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439-3443; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 214-218; Better et al., 1988, *Science*, 240, 1041-1043; Harlow & Line, «Antibodies: A Laboratory Manual», цит. Вище]. Повний зміст цих публікацій включений тут для зведення у вигляді бібліографічних посилань.

Антиідіотипове антитіло - антитіло, яке розпізнає унікальні епітопи, в принципі, асоційовані з антигенним-зв'язуючим сайтом антитіла. Антиідіотипове антитіло може бути отримане шляхом імунізації тваринного того ж виду і генетичного типу (наприклад, інбредної лінії мишей) по відношенню до джерела даного моноклонального антитіла, до якого має бути отримане антиідіотипове антитіло. Імунізована тварина буде розпізнавати і реагувати на ідіотипові детермінанти імунізуючого антитіла з виробленням антитіла, специфічного у відношенні цих ідіотипів (тобто антиідіотипове антитіло): [див., наприклад, патент США №4699880], який включено тут для зведення у вигляді бібліографічного посилання.

Саме антиідіотипове антитіло може бути використане в якості «імуногена» з метою індукції імунної відповіді ще у одній тварині з отриманням т.з. «анти-антиідіотипового антитіла». Анти-антиідіотипове антитіло може бути по епітопам ідентично початковому MAT, яке було індуктором антиідіотипового антитіла. Отже, з використанням антитіл до ідіотипічних детермінантів MAT можливим стає ідентифікувати інші клони, експресуючі антитіла, що характеризуються ідентичною специфічністю.

Таким чином, моноклональні антитіла, сформовані до білків RAP-2, його аналогів, фрагментів або

похідних за даним винаходом, можуть бути використані для індукції антиідіотипічних антитіл у відповідних тваринах, таких як миші лінії BALB/c. Клітини селезінки таких імунізованих мишей використовуються для вироблення антиідіотипічних гібридом, секретуючих антиідіотипі MAT. Далі, антиідіотипічні моноклональні антитіла можуть бути сполучені з носієм, таким як гемоціанін молюска (KLH), і використані для імунізації мишей BALB/c додатково. Сироватка таких мишей будуть містити анти-антиідіотипічні антитіла, які характеризуються зв'язуючими властивостями з початковими MAT, специфічними відносно епітопа названих вищим за білок RAP-2 або його аналоги/фрагментів і похідних.

Таким чином, антиідіотипічні моноклональні антитіла мають свої власні ідіотипічні епітопи - «ідіотопи», - структурно схожі з епітопом, що оцінюється, таким як GRB білка-A.

Термін «антитіло» також покликаний включити і інтактні молекули, і їх фрагменти, такі як, наприклад, Fab і F(ab')<sub>2</sub>, які здатні зв'язувати антигенний. Фрагменти Fab і F(ab')<sub>2</sub> позбавлені Fc-фрагмента зі складу інтактного антитіла, легше виділяються з кровотоку і можуть виявляти менший рівень неспецифічного зв'язування в порівнянні з інтактним антитілом (Wahl et al., 1983, J.Nucl. Med., 24, 316-325).

Має бути зрозумілим, що Fab і F(ab')<sub>2</sub>, і інші фрагменти антитіл, застосовні відповідно до даного винаходу, можуть бути використані для детекції і кількісного аналізу білка RAP-2 відповідно до методів, заявлених тут для інтактних молекул антитіл. Такі фрагменти звичайно отримують шляхом протеолітичного розщеплення із застосуванням таких ферментів, як папаїн (для отримання фрагментів Fab) або пепсин (для отримання фрагментів F(ab')<sub>2</sub>).

Про антитіло говориться, що воно «здібно зв'язуватися» з молекулою тоді, коли воно здатне специфічним чином реагувати з даною молекулою так, щоб зв'язувати цю молекулу і це антитіло. Термін «епітоп» позначає ту ділянку будь-якої молекули, яка може бути пов'язана антитілом і яка також може бути розпізнана таким антитілом. Епітопи, також звані «антигенними детермінантами», звичайно включають хімічно активні поверхневі угруповання молекул, таких як амінокислот або бічних ланцюгів вуглеводів, і характеризуються специфічною просторовою структурою, рівно як характерними параметрами електричного заряду.

Термін «антиген» - це молекула або частина молекули, здатна бути пов'язаною антитілом, яка додатково здатна індукувати вироблення у тваринного антитіла, здатного зв'язуватися з епітопом даного антигену. Антигенний може включати один або більше одного епітопи. У зв'язку з названим вище «специфічне реагування» позначає те, що антигенний буде реагувати у високо вибіркової манері з відповідним антитілом, але не з безліччю інших антитіл, які можуть бути ініційовані іншими антигенами.

Антитіла, включаючи фрагменти антитіл, застосовні за даним винаходом, можуть бути використані для якісної або кількісної детекції білка RAP-2 в зразку або для виявлення присутності клітин, яких експресують білок RAP-2 за даним винаходом. Це може бути здійснено із застосуванням імуофлуоресцентних методів, заснованих на флуоресцентному поміченні антитіл (див. далі) і методах детекції на світловому мікроскопі, з допомогою проточної цитометрії або флуориметрії.

Антитіла або їх фрагменти, застосовні відповідно до даного винаходу, можуть бути використані гістологічно при проведенні імуофлуоресцентної або імуоелектронної мікроскопії для детекції *in situ* білка RAP-2 за даним винаходом. Детекція *in situ* може бути здійснена шляхом взяття гістологічної проби від пацієнта і накладення на отриманий зразок поміченого антитіла за даним винаходом. Антитіло (або фрагмент) переважно наносять шляхом накриття біологічного зразка поміченим антитілом (або фрагментом). За допомогою використання такої процедури можливим є визначити не тільки присутність білка RAP-2, але і його розподіл в тканині, що аналізується. На основі даного винаходу фахівець в даній області техніки легко зможе зрозуміти, що будь-який з широкого кола гістологічних методів (таких як процедури фарбування) можуть бути модифіковані з метою забезпечення даної детекції *in situ*.

Дані тести на виявлення білка RAP-2 за даним винаходом звичайно включають інкубацію біологічного зразка, такого як біологічна рідина, тканинний екстракт, свіже зібрані клітини, такі як лімфоцити або лейкоцити, або клітини, які були проінкубовані в культурі, в присутність виявляється поміченого антитіла, здатного ідентифікувати білок RAP-2, з подальшим виявленням даного антитіла із застосуванням будь-кого з методів, добре відомих в даній області техніки.

Біологічний зразок може бути оброблений твердо фазною підкладкою або носієм, такою як нітроцелюлоза, або іншими твердими підкладками або носіями, які здатні іммобілізувати клітини, клітинні частки або розчинні білки. Підкладка або носій можуть потім бути промиті відповідними буферами з подальшою обробкою виявляється поміченим антитілом відповідно до даного винаходу, як це відзначалося вище. Твердо фазна підкладка або носій можуть бути потім промиті буфером у другий раз з метою видалення незв'язана антитіла. Кількість пов'язаної мітки на згаданій твердій підкладці або носії потім може бути визначена із застосуванням стандартних методів.

Під «твердо фазною підкладкою», «твердо фазним носієм», «твердою підкладкою», «твердим носієм», «підкладкою» або «носієм» розуміється будь-яка підкладка або носій, здатні зв'язувати антигени або антитіла. Добре відомі підкладки або носії включають скло, полістирен, поліпропілен, поліетилен, декстрин, нілонамілазу, природну і модифіковану целюлозу, поліакриламід, габро і магнетит. За своєю природою такий носій може бути розчинним в деякій мірі або нерозчинним зовсім, виходячи з цілей даного винаходу. Матеріал підкладки віртуально може характеризуватися будь-який структурної конфігурацією, лише б зв'язана на ньому молекула була здатна зв'язуватися з антигеном або антитілом. Таким чином, форма підкладки або носія може бути сферичною, як у кульки, циліндричної, як внутрішня поверхня пробірки або зовнішня поверхня палички. З іншого боку, поверхня може бути плоскою, такою як у пластинки, тест-смужки і т.п. Переважними підкладками або носіями є полістиролові кульки. Фахівцеві в даній області техніки мають бути відомі і інші відповідні носії для зв'язування на них антитіла або антигену або вони можуть підібрати їх за допомогою рутинних експериментів.

Активність по зв'язуванню даного набору антитіл за даним винаходом, як вони описувалися вище, може бути визначена відповідно до добре відомих процедур. Фахівці в даній області техніки зможуть визначити оперативний і оптимальний тест для кожного такого тестування із застосуванням рутинного

експериментування.

Інші етапи, такі як промивка, перемішування, струшування, фільтрування і подібне можуть бути включені в дані тести в залежності від бажаності або необхідності виходячи з конкретної ситуації.

Одним із шляхів, по якому антитіло за даним винаходом може бути, виявлено помічено, є зв'язування його з ферментом із застосуванням його в ферментному імуотестуванні (E1A). У свою чергу, даний фермент, після того як він буде оброблений відповідним субстратом, буде реагувати з цим субстратом таким чином, що утвориться хімічна складова, яка може бути детектована, наприклад, спектрометрично, флуориметрично або візуально. Ферментами, які можуть бути використані для помічення, антитіл що виявляються, є, таким чином не вичерпуючись, малатдегідрогеназа, нуклеаза стафілококку, ізомераза  $\Delta 5$ -стероїдів, алкогольдегідрогеназа дріжджів,  $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогеназа, триозофосфатізомераза, пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, аспарагіназа, глюкозооксидаза,  $\beta$ -галактозидаза, рибонуклеаза, уреаза, каталаза, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, глюкоамілаза і ацетилхолінестераза. Детекція може бути здійснена за допомогою колориметричних методів, в яких для даного ферменту використовується хромогенний субстрат. Також детекція може бути здійснена шляхом візуального порівняння міри каталітичної реакції субстрату в порівнянні зі стандартами, приготованими аналогічним чином.

Детекція може бути здійснена з використанням будь-якого з інших імунологічних тестів. Наприклад, за допомогою радіоактивного помічення антитіл або фрагментів антитіл можливим є виявлення RPT-ази шляхом використання радіоімуотестування (RIA). Докладний опис методу RIA може бути знайдений в лабораторії Laboratory Techniques & Biochemistry in Molecular Biology, виконане T.S. Work et al., 1978, North Holland Publ. Co. з конкретним відсиланням до розділу «An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques», написаного T. Chard: включено тут для зведення у вигляді бібліографічного посилання. Радіоактивний ізотоп може бути детектовано за допомогою таких способів, як використання лічильнику сцинтиляцій, або авторадіографічно.

Також можливим є помічені антитіла відповідно до даного винаходу з використанням флуоресцентної сполуки. Коли флуоресцентно помічене антитіло опромінюють при необхідній довжині хвилі, то його присутність визначається завдяки флуоресценції. Серед найчастіше застосовуваних флуоресцентних мітятих сполук - флуоресцеїну ізотіоціанат, родамін, фікоеритрин, пікоціанін, алофікоціанін, о-фталевий альдегід і флуорескамін.

Також антитіло може бути виявлено помічено з використанням емітуючих металів, таких як ізотоп  $^{125}\text{E}$  або інші лантаноїди. Ці метали можуть бути приєднані до антитіла за допомогою груп-хелаторів таких металів, таких як диетилентриамінпентаоцтова кислота (ЕТРА).

Також антитіло може бути помічено шляхом його сполучення з хемолюмінесцентною сполукою. Присутність хемолюмінесцентно поміченого антитіла потім визначають по виявленню присутності люмінесценції, яка спостерігається в ході хімічної реакції. Прикладами конкретно застосовуваних хемолюмінесцируючих мітятих сполук є люмінол, ізолюмінол, тероматичний ефір акридинію, імідазол, солі акридинію і щавлевий ефір.

Також біоломінесцентна сполука може бути використана для помічення антитіла за даним винаходом. Біоломінесценція - це форма хемолюмінесценції, що має місце в біологічних системах, в яких маючи каталітичні властивості білки підвищують ефективність реакції хемолюмінесценції. Присутність біоломінесцентного білку визначається шляхом виявлення присутності люмінесценції. Важливими біоломінесцентними сполуками, придатними для цілей помічення, є люциферин, люцифераза і екворин.

Молекула антитіла за даним винаходом може бути адаптована для застосування в імуометричному тесті, також відомому як «двохсайтовий тест» або «сендвіч-тест». У типовому імуометричному тесті деяка кількість непоміченого антитіла (або фрагмента антитіла) зв'язується з твердою підкладкою або носієм, а деяка кількість поміченого розчинного антитіла, що виявляється додається так, щоб забезпечити виявлення і (або) кількісне визначення потрібного комплексу, що утворюється твердо фазним антитілом, антигеном і поміченим антитілом.

Звичайні і в той же час переважні імуометричні тести включають «форвард-тести», в яких антитіло, зв'язане на твердій підкладці, спочатку контактують із зразком, що тестується на предмет екстракції антигену з даного зразку шляхом утворення подвійного комплексу «антиген-антитіло» в твердій фазі. Після відповідного періоду інкубації тверду підкладку або носій промивають з метою видалення залишку рідкого зразка, що включає непрореагувавший антиген, якщо він там є, і потім контактують з розчином, що містить невідому кількість поміченого антитіла (яке є «репортерною молекулою»). Після другого періоду інкубації, необхідного для з'єднання поміченого антитіла з комплексом з антигеном, пов'язаним на твердій підкладці або носії через непомічене антитіло, тверду підкладку або носій промивають вдруге з метою видалення непрореагувавшего поміченого антитіла.

В іншому варіанті «сендвіч-тесту», який також може бути застосований з у відношенні антигенів за даним винаходом, використовуються так звані «одночасні» і «реверсні» тести. «Одночасний тест» включає єдиний етап інкубації, в якому антитіло, пов'язане на твердій підкладці або носії, і помічене антитіло додають до зразку, який має бути протестовано, в один і той же час. По завершенні інкубації тверду підкладку або носій промивають з метою видалення залишку рідкого зразка і поміченого антитіла, що не увійшло до комплексу. Присутність поміченого антитіла, асоційованого з твердою підкладкою або носієм, потім визначають, як і в звичайному «форвард-сендвіч-тесті».

У «реверсному тесті» застосовується послідовне додавання спочатку розчину поміченого антитіла до рідкого зразка з подальшим додаванням непоміченого антитіла, пов'язаного з твердою підкладкою або носієм після відповідного часу інкубації. Після другої інкубації тверду фазу промивають стандартним чином для звільнення її від залишку тестованого зразка і розчину непрореагувавшего поміченого антитіла. Потім визначення поміченого антитіла, асоційованого з твердою підкладкою або носієм, проводять так само, як в «одночасному» і «форвард» тестах.

Білки RAP-2 за даним винаходом можуть бути отримані за допомогою будь-якої стандартної методики

рекомбінантної ДНК [див., наприклад, Sambrook et al., 1989 і Ausubel et al., 1987-1995, цит. Вище], в яких відповідні еукаріотичні або прокаріотичні клітини-господарі, добре відомі, в даній області техніки, трансформують з використанням відповідних еукаріотичних або прокаріотичних векторів, що включають послідовності, що кодують білки. Відповідно, даний винахід також стосується таких експресуючих векторів і трансформованих організмів-господарів для цілей вироблення білків за даним винаходом. Як відзначалося вище, ці білки також включають біологічно активні аналоги, фрагменти і похідні, а, отже, вектори, їх що кодують, також включають вектори, що кодують аналоги і фрагменти даних білків, а трансформовані організми-господарі включають тих, які виробляють такі аналоги і фрагменти. Похідні цих білків, що виробляються даними трансформованими організмами-господарями, є похідними, що отримуються за допомогою стандартних модифікацій білків або їх аналогів або фрагментів.

Також даний винахід стосується фармацевтичних композицій, що містять рекомбінантні вектори на основі вірусів тварин, кодуючи білки RAP-2, при тому, що такий вектор також кодує поверхневий вірусний білок, здатний зв'язуватися зі специфічними поверхневими білками клітини-мішені (наприклад, пухлинних клітин), що забезпечує внесення послідовностей білка RAP-2 всередину цих клітин. Додатково фармацевтичні композиції за даним винаходом містять як активний компонент (а) олігонуклеотидну послідовність, що кодує протисмислову послідовність по відношенню до послідовності гену RAP-2, або (б) лікарські засоби, які блокують взаємодію RAP-2/RIP.

Фармацевтичні композиції відповідно до даного винаходу містять кількість активного компоненту, достатню для досягнення поставленої задачі. Крім того, фармацевтичні композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні носії, включаючи наповнювачі і добавки, які полегшують перетворення активних сполук в препарати, які можуть бути використані фармацевтично, і які можуть стабілізувати такі препарати з точки зору їх введення пацієнтові у разі необхідності цього, що добре відомо фахівцям в даній області техніки.

Білок RAP-2 і його ізоформи або ізотипи, як передбачається, експресуються в різних тканинах на рівні, що виразно розрізняється і, мабуть, також з різним складом ізотипів аналогічно з параметрами експресії різних інших білків, що беруть участь у внутрішньоклітинних сигнальних механізмах, що обговорюється в тематично пов'язаних патентних заявках, що називалися вище. Ці відмінності, як передбачається, можуть визначати відмінності у відповідях різних тканин на ліганд Fas/APO1 і TNF. Як і у випадку з іншими CED3/ICE-гомологами [Wang et al., 1994; Anetli et al., 1995], заявники даного винаходу раніше показали (в згаданих вище патентних заявках), що ізоформи MACH, які включають сегменти неповної гомології з CED3/ICE (наприклад, MACHaC), як було показано, мають інгібіторний вплив на активність одночасно експресованих молекул MACHa1 або MACHa2; також вони блокують загибель клітин, що індукуються рецепторами Fas/APO1 і p55-R. Експресія таких ізоформ-інгібіторів в клітинах може брати участь в механізмі клітинного самозахисту від цитотоксичності, опосередкованої Fas/APO1 і TNF. Схожий ефект інгібування принаймні деяких ізоформ протеази G1 також передбачається (G1 - недавно виділений новий Mch4- і вірогідно MACH-зв'язуючий білок, а також, MORT1-зв'язуючий білок, в складі якого є «MORT-домен» і протеазний домен: [див. тематично пов'язану ізраїльську патентну заявку IL 120367]). Значна різноманітність ізоформ MACH, а також передбачувана так же істотна гетерогенність ізоформ G1, які значною мірою перевершують такі, відомі для інших представників протеазної родини CED3/ICE, повинна забезпечувати тонку настройку функцій активних ізоформ MACH, а аналогічно - і активних ізоформ G1. Отже, як відзначалося вище, білки RAP-2 і його вірогідні ізоформи можуть мати диференційовані ефекти в різних тканинах з точки зору їх взаємодії з білком RIP і таким чином впливом на баланс між механізмами активації загибелі клітин або виживання клітин, про які говорилося вище.

Також є можливим, що деякі з вірогідних ізоформ RAP-2 виконують відмінні функції. Наприклад, сам білок RAP-2 або деякі ізоформи RAP-2 також можуть виконувати роль «депо»-сайтів для молекул, які беруть участь в інших, не пов'язаних з цитотоксичністю, виявах рецепторів Fas/APO1 і TNF через взаємодію з білком RIP або навіть незалежно від RIP.

Завдяки унікальній здатності рецепторів Fas/APO1 і TNF зумовлювати запалення, загибель клітин, рівно як і здібності рецепторів TNF зумовлювати іншу активність по пошкодженню тканин, порушення функцій цих рецепторів може, зокрема, мати негативні наслідки для організму. Дійсно, і надмірні, і дефектні функції цих рецепторів, як було показано, беруть участь в патогенезі різних захворювань (Vassalli, 1992; Nagata & Golstein, 1995). Ідентифікація молекул, які беруть участь в сигнальній активності рецепторів і виявлення шляхів модулювання активності таких молекул може дозволити знайти нові терапевтичні підходи. Інші аспекти даного винаходу будуть зрозумілі з наведених нижче прикладів.

Тепер даний винахід буде більш детально охарактеризований за допомогою наведених нижче прикладів, що не є обмежувачими в будь-чому, і супроводжуваних креслень.

Необхідно зазначити, що наступні процедури:

(1) двогибридний скрінінг і двогибридний тест на експресію  $\beta$ -галактозидази; (2) індукована експресія, метаболічне помічення і імунопреципітація білків; (3) зв'язування *in vitro*; (4) оцінка цитотоксичності; і (5) Нозерн-блотинг і секвенування (див. також Boldin et al., 1995b) 2, 3 (див. також Boldin et al., 1996) і 4, див. нижче, по відношенню до MORT-1 і MORT1-зв'язуючому білка (наприклад, білка MACH), рівно як і нового виділеного білка G1 [див. заявку IL 120367], - в однаковій мірі застосовні (з невеликими модифікаціями) для відповідного виділення, клонування і охарактеризування білка RAP-2 і його вірогідних ізоформ за даним винаходом. Отже, ці процедури можуть бути витлумачені, як повне представлення таких процедур, що використовуються для виділення, клонування і охарактеризування RAP-2 відповідно до даного винаходу, що детально описано, наприклад, в такій же або еквівалентній формі в тематично пов'язаних [ізраїльських патентних заявках №№114615, 114986, 115319, 116588, 117932 і 120367, рівно як і відповідній заявці PCT №PCT/US 96/10521]. Далі, що стосується білка NIK і його ролі в активації чинника NF-KB, а, отже, і виживання клітин, а також ролі TRAF2 в цьому механізмі виживання клітин, наприклад, за рахунок взаємодії між TRAF2 і RIP і іншими білками, то вони детально описані заявниками даного винаходу в тематично пов'язаних [ізраїльських патентних заявках IL 117800 і IL 119133 і у Malinin et al., 1997].

Приклад 1

Клонування і виділення білка RAP-2, який зв'язується з білком RIP  
Двохгібридний скрінінг, секвенування і попередній аналіз

Із застосуванням двоохгібридного скрінінгу з використанням як «наживки» білка RIP [див., наприклад, Fields & Song, 1989, міжнародна патентна заявка WO 96/18641] в бібліотеці В-лімфоцитів було виділено клон розміром приблизно 1500 пар нуклеотидів. Цей 1500-нуклеотидний клон (див. стрілку на Фіг.1 і 2) використали для скрінінгу фагової бібліотеки кДНК, отримавши в результаті клон довжиною приблизно 2000 пар нуклеотидів, нуклеотидна послідовність якого показана на Фіг.1.

Шляхом зіставлення EST-маркерів з послідовністю 1500-нуклеотидного клону було виділено EST-фрагмент, який представляв 3'-кінець елемент I.M.A.G.E. клону №41072 (Research Genet. Inst). Зі складу цього клону, що походить з бібліотеки плідного головного мозку, були опубліковані раніше тільки невеликі 3'- і 5'-кінцеві фрагменти послідовностей. Після виділення цього клону його було секвеновано, і було з'ясовано, що навіть невеликі опубліковані ділянки містили помилки. Як було встановлено, секвенований клон (Фіг.2) був ідентичним клону, показаному на Фіг.1, по його кодуючій ділянці, але характеризувався відмінностями по 5'-некодуючому сегменту. Таким чином, було передбачено, що обидві ці кДНК являють собою продукти альтернативного сплайсінга транскрипту одного і того ж гену.

Аналіз даної нуклеотидної послідовності показує, що, як і білок RAP, білок RAP-2, мабуть, не має «домену загибелі» в своєму складі, не має т.з. «MORT-модулю», не має протеазного домену, характерного для членів родини ICE, не має кіназного домену, а також не включає «TRAF-доменів» (див. тематично родинні патентні заявки, що приводилися вище і різні бібліографічні посилання, зокрема, на роботу Malinin et al., 1997, в зв'язку з роллю різних доменів у внутрішньоклітинних сигнальних механізмах). У складі даної послідовності не було виявлено будь-яких значущих доменів, за винятком трьох мотивів типу «лейцинової блискавки» - подібні блоки рівномірно розподілені по довжині кодуючої білок послідовності. Ці домени названі «подібними» «лейциновим блискавкам» тому, що в двох з них є заміни лейцину на валін, метіонін або ізолейцин. Оскільки звичайно ці домени високо консервативні, доки незрозуміло, чи зберігають білку такі зміни в складі «лейцинових блискавок» його функціональну активність, а саме зв'язування з іншими «лейциновими блискавками». Аналіз на зв'язування показав, що RAP-2 в істотній мірі зв'язується з RIP, але RAP-2 не здатний зв'язуватися з білками TRADD, MORT-1, p55-R, p74-R і MACH (в об'ємі досліджень, проведених до теперішнього часу). Отримані результати підтверджують той факт, що RAP-2, мабуть, позбавлений «доменів загибелі» і «MORT-модулів».

Отже, вважається, що RAP-2 є вузькоспецифічним RIP-зв'язуючим білком, який взаємодіє/зв'язується з білком RIP дуже специфічним чином. Таким чином, RAP-2, мабуть, є специфічним модулятором/медіатором внутрішньоклітинної активності RIP, що грає важливу роль в модуляції/опосередкуванні за участю RIP механізмів запалень, загибелі клітин і виживання клітин.

Коротко, клон RAP-2 було отримано в процедурі двоохгібридного скрінінгу бібліотеки кДНК В-клітин людини з використанням як «наживки» повно розмірного білка RIP. Послідовність RIP була взята з попередніх публікацій (наприклад, Stanger et al., 1995), як депонована в базу даних GenBank під №U-25994, яка є послідовністю RIP людини (також під №U-25995 присутня послідовність білка RIP миші). На основі цієї інформації про послідовності затравки для ПЛР були сконструйовані за допомогою програмного продукту OLIGO4™, а фрагмент ДНК, відповідний кодуючій частині гену RIP, був отриманий з допомогою ПЛР з використанням як матриці кДНК, отриманої на матеріалі тотальної РНК бібліотеки фібробластів людини (за допомогою стандартних процедур). Ця кодуюча ділянка RIP потім була клонована до складу вектору pGBT-9 (Clontech) і використана як «наживка» відповідно до того, що відмічалось вище для двоохгібридної тест-процедури. При такому двоохгібридному скрінінзі було виділено клон, що кодує, RIP-зв'язуючий білок, який взаємодіє з RIP.

Цей клон, як зазначено вище, був використаний для скрінінга фагової бібліотеки кДНК і бази даних по маркерах EST. Як можна бачити з Фіг.1 і 2, кодуючі послідовності двох клонів ідентичні, в той час як 5'-некодуючі ділянки розрізняються. Таким чином, передбачається, що вони є формами, що утворюються в результаті альтернативного сплайсінгу. Довжина клонів становить приблизно 2000 пар нуклеотидів, на частку ORF (відкритої кодуючої рамки) доводиться приблизно 1500 пар нуклеотидів, а розрахункова молекулярна маса білка, що кодується ними становить приблизно 50кД. Розшифрована амінокислотна послідовність білка RAP-2 показана на Фіг.3.

Аналіз вказаних вище послідовностей клону RAP-2 і послідовностей в базі даних «dbest», базі даних проекту «Геном людини» (level 1) і базі даних GenBank показав, що послідовність RAP-2 є унікальною (ною) послідовністю, тому що жодна з відомих послідовностей не виявила будь-якої істотної гомології з цією послідовністю RAP-2. Після подачі [ізраїльської патентної заявки IL 123758], пріоритет якої підтримується справжньою заявкою, Ямаокою із співавт. (Yamaoka et al., 1998) було повідомлено про характеристику мишачої кДНК, що кодує білок з молекулярною масою 48кД, який був позначений як NEMO (функціональний модулятор чинника NF-KB) (див. розділ «Передумови для винаходу»).

Додаткові пошуки в базах даних (in silico) дозволили ідентифікувати білок FIP-2 - білок з невідомими функціями, початково клонований Лі із співавт. [Y.Li et al., 1998: див. розділ «Передумови для винаходу»].

Як можна бачити з повно розмірного зіставлення послідовностей RAP-2 і FIP-2 (Фіг.3В), міра загальної схожості вельми низька (тому не дивно, що ця послідовність не була знайдена при використанні загальних алгоритмів такого скрінінгу). Гомологія між RAP-2 і FIP-2 зростає у напрямі до С-кінцевої частини цих білків, досягаючи віртуальної ідентичності по С-кінцевих 30 амінокислотах. Заслугує уваги і те, що, крім, останньої ділянки, передбачуваний мотив типу «лейцинової блискавки» в складі FIP-2 в істотній мірі консервативний і в RAP-2 (за винятком амінокислотної заміни ізолейцину на аланін).

Додатково також, була ідентифікована більш коротка кДНК RAP-2 довжиною 500 пар нуклеотидів (ID 1469996), яка була позначена як Human shrt. Цей варіант включав в себе «блоки» кодуючої послідовності, що відбуваються від різних роз'єднаних ділянок «повною» кДНК довжиною 1500 пар нуклеотидів, механізм виникнення яких, мабуть, пов'язаний з альтернативним сплайсінгом одного і того ж гену.

Аналіз методом Нозерн-блотингу з реактивами Multiple Tissue Northern blot (Clontech) з BgIII-фрагментом довжиною 900 пар нуклеотидів кДНК RAP-2 підтвердив комплексний характер мРНК RAP-2. Принаймні 5 диференційованих мРНК довжиною від менше за 1000 нуклеотидів до більше ніж 7 тисяч нуклеотидів були виявлені при більш або менш постійному домінуванні варіантів довжиною 2500 і 6500 нуклеотидів (Фіг.4А).

#### Приклад 2

##### Ідентифікація RAP-2 миші

Схожий пошук в колекції маркерів EST, сформованій в TIGR, дозволив виділити часткову кДНК довжиною 1600 нуклеотидів (Mouse part, ID 761011; Фіг.3), яка приблизно відповідає RAP-2 миші, оскільки вона віртуально ідентична (95%) гомологічній послідовності людини по кодуєчому сегменту (див. Фіг.3).

Проте відмінності між послідовностями RAP-2 і NEMO людини і миші перевищують той рівень, який може бути прийнятний для нормального міжвидового диференціювання. Дійсно, проміжний блок з 7 амінокислот (249-е положення в 20.4) в послідовності RAP-2 миші і в послідовності NEMO і вставка 3 амінокислот (KLE в 111-м положенні) в кодуєчій рамці послідовності NEMO в порівнянні з повно розмірним варіантом людини і з частковою послідовністю миші є лише найбільш виразними прикладами відмінностей (Фіг.3). Однак, це може бути результатом відображень функціональної активності даного білка. Функціональні властивості, дійсно підтверджені для білка NEMO, мабуть, протилежні таким у RAP-2 людини, хоч повідомлені результати фракційного аналізу NEMO підтверджують його локалізацію в зв'язку з «сигналосомою».

#### Приклад 3

##### Зв'язування RIP з RAP-2 в клітинах ссавців

Подальше підтвердження фізіологічного значення взаємодії RAP-2/RIP було отримане в трансфектованих клітинах ліній HEK-293T і HeLa. Дійсно, ці два білки можуть бути легко копреципітовані з клітинних лізатів клітин HEK-293T (ATCC №CRL-1573), трансфектованих так, як це вказано нижче за кожну доріжку на Фіг.4В, і імунопреципітовані з анти-FLAG моноклональним антитілом (Kodak). Потім імунокомплекси аналізували на присутність в них HIS/RAP-2 із застосуванням стандартного Вестерн-блотингу з використанням антитіла до гексагістидину (Sigma) (Фіг.4В, а також дані не включені). Однак, утворення такого комплексу не зумовлює каталітичної активності RIP: в тій мірі, в якій можна судити за даними тесту на кіназну активність імунокомплексів *in vitro*, над-експресія RIP не призводить до фосфорилування білка RAP-2 (дані не показані).

Тести на зв'язування були проведені з метою визначення того, чи зв'язується RAP-2 з будь-яким з інших відомих внутрішньоклітинних сигнальних білків. У цих тестах білки TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R, MACH були протестовані на їх здатність зв'язуватися з білком RAP-2. Однак, було встановлено, що RAP-2 не здатний зв'язуватися ні з одним з цих білків. Також RAP-2 не зв'язується з будь-яким з тестованих контрольних білків, наприклад, з ламіном і цикліном-D.

Всі приведені вище результати, таким чином, вказують на те, що новий білок RAP-2, мабуть, взаємодіє з RIP по високо специфічному типу, а раз так, то він є високо специфічним модулятором/медіатором RIP.

#### Приклад 4

##### Взаємодія RAP-2 з NIK і модуляція ним транскрипції, Контрольованої NF-KB і c-Jun

Хоч при проведенні двогибридних дріжджових тестів не було взаємодії RAP-2/NIK (див. вище), експерименти по трансфекції клітин HEK-293T ссавця показали стабільне утворення такого комплексу. Взаємодія RAP-2/NIK була виявлена відповідно до описаного в прикладі 3, за винятком того, що анти-FLAG антитіла були використані в методі Вестерн-блотингу з подальшою імунопреципітацією з антитілами до гексагістидину (Фіг.4С). Така невідповідність між параметрами зв'язування в дріжджових клітинах і клітинах ссавця не була дивною, оскільки повно розмірна NIK має тенденцію втрачати свої зв'язуючі властивості у випадку експресування в клітинах дріжджів.

З точки зору того факту, що *in vivo* і RIP, і NIK, як передбачається, є обов'язковими медіаторами TNF-індукованої активації транскрипційного чинника NF-KB, заявники вивчали те, чи здатна надмірна експресія RAP-2 в клітинній культурі взаємодіяти з цим конкретному сигнальним механізмом. Початковий набір експериментів був проведений на клітинах HEK-293T, по непостійному типу трансфектованих репортерними плазмідами, що включають ген люциферази, що знаходиться під контролем мінімального промотору HIV-LTR. У близькому наборі, в якому було встановлено, що RAP-2 зазнає негативної регуляції, який повертається майже на початковий рівень, активація репортера зумовлювалась і надекспресією різних відомих індукторів NF-KB, залучених до сигнального шляху TNF (NIK, TRAF2, RIP і інш.), і обробкою клітин зовнішніми стимулами (TNF і PMA: Фіг.5А). Клітини HEK-293T були по непостійному типу трансфектовані репортерною плазмідом (активаційний тести з HIV-LTR-Luc або CMV-Luc для NF-KB - 5А; і GAL4-Luc для c-Jun - 5В) і експресуючим вектором для конкретного індуктора, а також або пустим носієм (pcDNA3), або плазмідом, що кодує повно розмірний білок RAP-2 (pcRAP-2). Треба зазначити, що той факт, що RAP-2 здатний виявляти свої ефекти на такому далекому етапі сигнального шляху, як чинник RelA, свідчить про те, що принаймні частково активність даного білка повинна бути загальною для різних, іншими словами дивергованих, сигнальних механізмів (див. далі). В той же час KB-незалежна (раннім промотором, що контролюється CaMV) транскрипція люциферази не порушується (Фіг.5А): отже, можна вважати підтвердженою загальну неузгодженість базового механізму транскрипції/трансляції з участю RAP-2. Ці результати були після цього підтверджені в аналізі на клітинах лінії HeLa (дані не включені).

Однак, в ході проведення подальших тестів було встановлено, що дане явище виявляється ще більш складним. Дійсно, коли TRAF2 був по типу, що переважається, експресовано в клітинах HEK-293T нарівні з різною кількістю pcRAP-2, що відображено на Фіг.6, активність RAP-2 різко змінювалась при його низьких концентраціях (приблизно 20нг на 1млн. клітин), посилюючи ефект TRAF2/NF-KB- транскрипції (див. Фіг.6А). Більш того шляхом заміни початкової вставки на вставку в протилежній орієнтації був отриманий ефективний носій, експресуючий протисомислову послідовність RAP-2, і TRAF2 по типу, що переважається трансфікували в клітини HEK-293T нарівні з різними конкретними кількостями конструкції pcRAP-2-a/s (протисомислова): був проаналізований ефект прогресуючого зникнення RAP-2, на основі чого була вистроєна діаграма залежності від концентрації. Загальна тенденція даного графіка вказує на те, що рівень реакції клітин, загалом, зворотно

пропорційний кількості трансфорованої ДНК RAP-2, за винятком характерної ділянки, яка знаходиться в своєрідній «нульовій точці», відповідній номінальному (базовому) ендogenous рівню даного білка (Фіг.6). Треба зазначити, що негативна регуляція експресії даного гену шляхом внесення протисмислової послідовності приблизно є більш тонкою, в протилежність смисловий надекспресії. Дійсно, протисмислова конструкція не зумовлює штучне вироблення якого-небудь чужорідного білка в даній клітині, а, отже, забезпечує виразну недолік інгібіторної здатності RAP-2. Проте, необхідно зазначити, що згадуваний вище «стрибок» низьких концентрацій відображений, не будучи розгорненим, в «протисмисловій половині» графіку (Фіг.6).

Для оцінки різноманітності транскрипційних систем, в які може бути залучений RAP-2, був проведений аналіз чинника c-Jun - ядерного чинника, роль якого в забезпеченні і підтримці адекватної реакції на стреси, як підтверджується, виявляється такий же, як і роль NF- $\kappa$ B. З використанням компонентів комерційної системи «Path Detect» (Stratagene) була підтверджена аналогічна «двохфазність» RAP-2 відносно деяких розпізнавальних активаторів AP-1 в клітинах HEK-293T і HeLa (див. Фіг.5У і 6В).

#### Приклад 5

Зумовлення білком RAP-2 гіперфосфорилування c-Jun без зміни активності JNK

Для аналізу механізму, що визначає даний істотний вплив на транскрипцію важливим було визначити точний рівень, на якому нормальний сигнальний шлях уривається. Відомо, що трансактиваційний потенціал c-Jun регулюється позаклітинним, сигналом, що індукується фосфорилуванням по двох залишках серину (в положеннях 63 і 73) в складі його N-кінцевого активаторного домену. Протеїнкінази JNK/SAPK, що відповідають за фосфорилування, що відзначалося вище, представляють відособлену групу родини MAP-кіназ, які здатні самоактивуватися в результаті фосфорилування по треоніну-183 і тирозину-185, опосередкованому додатковими біфункціональними по специфічності кіназами. Отже, наявність фосфорилування по відповідних сайтах в послідовностях c-Jun і JNK може бути використана як маркер, який відображає активований статус даного білка. Аналіз методом Вестерн-блотингу лізатів клітин HEK-293T, трансфорованих по непостійному типу, показав, що, незважаючи на порушення c-Jun-опосередкованої транскрипції, RAP-2 в істотній мірі здатний забезпечувати фосфорилування ендogenous кінази c-Jun по серину-63, що індукується рядом стимулів (див. Фіг.7А). Загальні клітинні лізати клітин HEK-293T, трансфорованих вказаними експресійними конструкціями поряд або з плазмідною pcDNA3, відміченої на Фіг.7 «мінусом» (-), або з плазмідною pcRAP-2, відміченою на тій же Фіг. «плюсом» (+), були протестовані методом електро-форезу в SDS-ПААГ, перенесені на ECL-мембрани і проібридизовані з антитілами (NEB), специфічними у відношенні фосфорилування по серину-63 c-Jun. Отримана мембрана зображена на нижній частині Фіг.7А - її повторно ібридизували з антитілами до загальної c-Jun, що служило контролем (NEB).

Однак, загальна кількість c-Jun залишається незмінною, за винятком підвищення рівнів c-Jun як можливе джерело модифікацій. Антитіла, специфічні у відношенні фосфорильованої форми JNK1/2, не дозволяють виявити будь-скільки істотного збільшення кількості цих активованих кіназ у відповідь на надекспресію білка RAP-2: це вказує на те, що додаткове фосфорилування c-Jun не зумовлювалося IAP2-залежним бустингом активності кіназ JNK (Фіг.7У). Активована JNK1/2 з клітин HEK-293T, трансфорованих або pcDNA3, або pcRAP-2, оброблених hrTNF $\alpha$  з метою підвищення періоду часу реакції, була виявлена в методі Вестерн-блотингу при аналізі повних лізатів з використанням антитіл до JNK, фосфорильованої по Thr-183/Tyr-185 (NED), що показано на Фіг.7.

Для подальшого підтвердження останнього факту кіназний тест *in vitro* з імунопреципітованої JNK1 і очищеною химерою GST/c-Jun як субстрат дозволив отримати принципово такі ж результати (Фіг.7С). Клітини HEK-293T були котрансфоровані «порожнім» вектором, плазмідами pcRAP-2 і pcRIP в різних сполученнях поряд з плазмідною, експресуючою химерою HA/JNK1. Потім JNK1 імунопреципітували на основі її N-кінцевої HA-мітки, а її здатність фосфорилувати вироблений бактеріями очищений GST-Jun визначали по включенню <sup>32</sup>P в кіназному тесті *in vitro*. Продукти реакції аналізували методом електрофорезу в SDS-ПААГ, що показано на Фіг.7.

Білок RAP-2 стає фосфорильованим тоді, коли він є імунопреципітованим з трансфорованих клітин HEK-293T комплекс RAP-2/IKK1 інкубується в умовах фосфорилування *in vitro*. Аналіз функціональної ролі фосфорилування білка RAP-2 показав, що мутування одного конкретного залишку серину (в 148-м положенні) повністю запобігає активації контрольованого ним фосфорилування Jun. Як показано на Фіг.13, хоч надмірна експресія RAP-2 дикого типу зумовлювала різке зростання фосфорилування Jun, надмірна експресія мутантного RAP2 (S148A) не придушує фосфорилування Jun взагалі. Однак, вплив RAP-2 на NF- $\kappa$ B не порушувався цією мутацією зовсім. Ці дані показують, що фосфорилування по серину-148 в послідовності RAP-2 специфічним чином залучено у вплив цього білка на фосфорилування Jim.

#### Приклад 6

Відсутність інгібування білком RAP-2 зв'язування c-Jun і RelA з ДНК

З точки зору того факту, що описані в прикладі 5 експерименти не дозволили встановити цитоплазматичної модуляції мішені надекспресії RAP-2 в сигнальних каскадах чинників NF- $\kappa$ B і AP-1, заявники проаналізували цілісність ядерних процесів, необхідних для здійснення транскрипції. Тест на зсув у величині електричної рухливості (EMSA) було здійснено на матеріалі ядерного екстракту трансфорованих клітин HEK-293T: він однозначно продемонстрував, що RAP-2 не порушує зв'язування c-Jun і RelA з олігонуклеотидами, відповідними класичним сайтам пізнання цих чинників (Фіг.8). Дійсно, було виявлене посилення в декілька разів ефективності утворення комплексу ДНК з AP-1 в клітинах, трансфорованих білком RAP-2. Більш того не було виявлено взаємодії між RAP-2 і c-Jun/RelA, що може бути зумовлено просторовим порушенням структури активаційний доменів останніх чинників. Було підтверджено, що, якщо він і існує, то ефект проникнення RAP-2 всередину ядра опосередковується на декілька етапів пізніше за етапи зв'язування енансерів.

#### Приклад 7

Взаємодія RAP-2 *in vivo* з ацетилтрансферазою гістонів TIP60

NIP60 (GeneBank: NeU-74667) відноситься до нещодавно описаної родини ядерних білків, званих ацетилтрансферазами гістонів (НАТ). Каталітична активність цих білків асоційована з певною організацією хроматину в нуклеосомах. Часто ферменти НАТ асоційовані з деякими елементами транскрипційного апарату і здатні модулювати швидкість транскрипції. НАТ діють шляхом ослаблення упакованості хроматину поблизу сайтів ініціації за рахунок перенесення ацильних груп на конкретні залишки лізину в послідовностях гістонів, таким чином зумовлюючи надмірність різних ДНК-зв'язуючих чинників. Мабуть, він є одним з тих допоміжних ядерних білків, які покликані забезпечити зв'язок між енхансер-зв'язуючими чинниками і РНК-полімеразою II. У зв'язку з цим заявники досліджували, чи може TIP60 утворювати комплекс з RAP-2. Імуно-преципітація з клітин HeLa з подальшими двохибридними тестами виразно підтвердила, що RAP-2 інтенсивно взаємодіє з TIP60 в обох системах. Проте не вдалося виявити будь-яких істотних змін в опосередкованому білком RAP-2 впливі на NF-KB і c-Jun після коекспресії TIP60 в клітинах HEK-293T (дані не включені). Така ж відсутність змін була встановлена в контрольному експерименті, тобто при стимуляції ± TIP60 без RAP-2, на основі чого робиться висновок про те, що наявність досить короткого часу (20-30 годин після трансфекції) не дає шансу репортерній ДНК конденсуватися, не залишаючи достатнього часу для активності НАТ-подібних ферментів.

#### Приклад 8

Клон №10 - новий білок, взаємодіючий з RAP-2

Застосовуючи повно розмірний білок RAP-2 як «наживку» в двохибридному скрінінзі бібліотеки кДНК В-лімфоцитів, було виділено новий білок, взаємодіючий з RAP-2, який в даному тексті позначений як «клон №10» або «кодований клоном №10 білок», або «RAP-2 зв'язуючий білок №10», або «RBP-10» (Фіг.10). Початковий клон (довжиною приблизно 2200 пар нуклеотидів), як було встановлено, кодує передбачуваний поліпептид з молекулярною масою 60 кД. Однак, передбачуваний старт-кодон ATG, мабуть, в цій послідовності відсутній. Незважаючи на досить значну довжину, виділена кДНК, мабуть, повинна тягнутися далі в 5'-напрямі до завершення повної кодувальної рамки.

У двохибридному тесті на репертуар зв'язування клону №10 було встановлено, що цей білок, крім RAP-2, має вельми істотну спорідненість відносно білка TRAF2. Однак, клон №10 не зв'язується з RIP, TRADD, MORT1, MACH, TNFR-1, TIP60 і NIK, рівно як і з деякими контрольними білками (наприклад, з ламіном і циклином). Однак, не можна виключати, що зв'язування клону №10 з NIK може бути виявлене в клітинах ссавців, з урахуванням властивостей NIK, що виявляються в клітинах дріжджів. Як було показано, клон №10 зв'язується з RAP-2 на 200-амінокислотній С-кінцевій ділянці NIK, тобто на ділянці, не обов'язково асоційованій зі зв'язуванням RIP, TIP60, NIK і IKKβ.

Коекспресія клону №10 і TRAF2 в клітинах HEK-293T ссавця запобігає опосередковану білком TRAF2 активацію чинника NF-KB, в той час як коекспресія клону №10 з NIK в істотній мірі посилює активацію NF-KB останньою. Ці дані можуть вказувати на важливу регуляторну функцію клону №10. Виявлені диференційовані модулюючі ефекти, мабуть, свідчать про існування різних неперекриваючихся сайтів, на які спрямована дія даного білка в клітині.

Деякі раунди пошуку в GenBank, зроблених з метою ідентифікації гомологів клону №10, призвели до виявлення F40F12.5 (депозитарний №S-42834) - гіпотетичного білка нематоди *C.elegans*, для якого фізіологічна роль доки не встановлена. Цікаво, що для білка F40F12.5 була встановлена певна схожість з деякими представниками значною мірою консервативної родини контрольованих убіквітином протеаз. Ці ферменти протидіють деструктивним механізмам, що забезпечуються убіквітином, який, як відомо, бере участь в більшості процесів руйнування білків в клітині. При тому, що лігази убіквітину пов'язані з прикріпленням поліубіквітинових молекул до призначеного для руйнування білка, протеази убіквітина запобігають ефективному розгалуженню зростаючої молекули («дерева») поліубіквітина. Таке припущення, що стосується функцій білка F40F12.5, засновується на схожості згадуваних убіквітином протеаз, що вище контролюються, однак, воно як і раніше залишається під питанням, оскільки доки не було проведено досліджень того, чи зумовлює даний конкретний білок яку-небудь каталітичну активність у відношенні поліубіквітинів. Більш того ряд моментів, як представляється, робить дане припущення вельми малоймовірним:

(а) амінокислотні залишки, які, як вважається, складають основу каталітичної ділянки в будь-якому з підкласів убіквітинпротеаз, не є консервативними ні в F40F12.5, ні в клоні №10;

(б) за винятком їх каталітичних сайтів, ферменти, що відносяться до контрольованих убіквітином протеаз, що походять від різних видів (від бактерій до людини), не виявляють будь-якої істотної схожості послідовностей, в той час як F40F12.5 і клон №10 характеризуються наявністю певного рівня гомології.

#### Приклад 9

Клон №84 - білок, взаємодіючий з RAP-2

Додатковий RAP-2 зв'язуючий білок був ідентифікований шляхом використання повно розмірного білка RAP-2 як «наживки» в двохибридній процедурі відносно бібліотеки кДНК В-лімфоцитів: він був позначений як «клон №84».

Було встановлено, що клон №84 специфічно зв'язується з повно розмірним RAP-2, в той час як не виявляє взаємодії з будь-яким з інших досліджуваних білків, включаючи TRAF2, MORT-1, TRADD, RIP, NIK, TIP60 і ламін. Часткова 5'-послідовність клону №84, як було показано, ідентична послідовності раніше клонованої кДНК, що кодує білок «регуляції клітинного зростання» (CGR19), ідентифікований в якості транскрипту, який специфічно позитивно регулюється в клітинах, що нагромаджують функціональний білок p53 (S.Madden et al., 1996; депозитарний №U-66469). Секвенування CGR19 дозволило ідентифікувати мотив «цинкові пальці» цистеїнз-гістидин-цистеїнз (що також позначається як «RING-палець») - в складі його С-кінцевого домену. Експресія CGR19, як було з'ясовано, придушує зростання деяких клітинних ліній. Залучення білка CGR19 до регуляції NF-KB за рахунок зв'язування з RAP-2, мабуть, вказує на модуляцію механізмів регуляції клітинних циклів членами родини TNF-рецепторів.

#### Приклад 10

Структурно-функціональні відносини RAP-2



#### А. Дільниці зв'язування

Із застосуванням аналізу послідовних делецій в послідовності RAP-2 були картовані сайти зв'язування і були ідентифіковані домени зв'язування RIP, NIK і TIP60, рівно як і домени самоасоціювання (Фіг.11).

Сайт зв'язування з RIP був визначений на дільниці білка RAP-2, яка починається між амінокислотами 177-218 і закінчується на амінокислоті 264.

Не було встановлено перекриття сайту зв'язування з RIP в послідовності RAP-2 ні з сайтом зв'язування з IKK $\alpha$ , ні з сайтом зв'язування NIK (відповідно, амінокислоти 95-264 і амінокислоти 1-264) (Фіг.11).

Сайт зв'язування з TIP60, мабуть, знаходиться на дільниці амінокислот 95-264. Відсутність взаємодії з делеційним фрагментом, що включає амінокислоти 95-309, найбільш ймовірно зумовлюється специфічним порушенням конформації білка, до якого призводить дана конкретна делеція.

Схожа невідповідність в скріпленні з делеційними фрагментами може бути відмічена по скріпленню клону №10 і для самоасоціації білка RAP-2. В протилежність до білка TIP60, однак, той факт, що повно розмірний RAP-2 зв'язується з делеційним фрагментом, що включає амінокислоти 218-416, рівно як і з делеційним фрагментом, що включає амінокислоти 1-264, вказує на те, що дільниця, залучена до процесу гомодимеризації, знаходиться між амінокислотами 217-264.

Білок, що кодується клоном №10, з урахуванням згаданого вище винятку, мабуть, зв'язується в сайті, що починається на дільниці, амінокислот 218-309 і що закінчується на дільниці амінокислоти 416, причому його сайт зв'язування може перекриватися з сайтами зв'язування RIP, NIK, IKK $\beta$  і TIP60 (Фіг.11).

#### Б. Функціональні дільниці

В тій мірі, в якій це було вивчено до даного моменту, всі функціональні вияви білка RAP-2 (а саме придушення NK-KB і індукція гіперфосфорилювання c-Jun) картується в одну і ту ж дільницю (Фіг.11).

Більш того можливо, що ця дільниця, істотна з точки зору ефективної модуляції передачі сигналу всіма індукторами, що використовувалися в проведених експериментах, знаходиться в М-кінцевому сегменті даного білка.

Дільниця амінокислот 95-416 характеризується певним виявом, хоч воно виявляється істотно більш слабим в порівнянні з тим виявом, який характерний для повно розмірного білка: отже, він може бути наслідком посиленої агрегації ендогенного RAP-2.

Більш того за винятком Re1A, вплив всіх індукторів, що використовувалися в проведених експериментах, може бути опосередковано, як мінімум, приблизно 100 N-кінцевими амінокислотами послідовності RAP-2. Дійсно, навіть фрагмент, що складається з амінокислот 1-102, опосередковує виразний ефект, хоч і вельми середній по силі (Фіг.12B).

З іншого боку, успішна індукція Re1A вимагає участі більш довгого фрагменту білка RAP-2. Доки є можливість визначити кордони цієї дільниці між амінокислотами 1 і 264 в якому, мабуть, знаходиться дільниця між амінокислотами 157 і 264, що володіє певною мірою специфічними зв'язуючими властивостями, асоційованими з Re1A.

#### В. Співвідношення функцій і зв'язування

Засновуючись на даних, показаних на Фіг.11 і 12, передбачається, що:

(а) за винятком Re1A, зв'язування RAP-2 з RIP, клоном №10 і, найбільш ймовірно, з NIK і TIP60 не залежить від власне функцій даного білка, пов'язаних з придушенням надекспресії, індукваної NK-KB;

(б) вплив RAP-2 на індуквану надекспресію Re1A активацію, очевидно, опосередковується, принаймні частково, різними процесами зв'язування. Істотне те, що всі згадувані вище білки, як можна бачити, беруть участь в забезпеченні такої активності, на що вказують дані проведених до теперішнього часу експериментів.

Точний сайт взаємодії між RAP-2 і RIP доки точно не визначений, однак представляється, що цей сайт є специфічним для RIP і RAP-2 і відсутній в інших білках, для яких відома взаємодія з RIP, таких як MORT-1, TRADD, FAS-R і, мабуть, також TRAF2 (див. Malinin et al., 1997). Також стає ясним (виходячи з даних секвенування і порівняння послідовностей різних баз даних, що відзначалися вище), що RAP-2 в своєму складі не має «згубного домену», «MORT-модуля», протеазного домену (наприклад, мотиву, характерного для протеаз ICE/CED3), кіназного домену або мотиву або TRAF-домени. У зв'язку з цим аналіз біологічної активності також підтвердив, що RAP-2, мабуть, характеризується наступним:

(1) у випадку надекспресії RAP-2 жорстко придушує активацію NK-KB, що зумовлюється TNF або надекспресією TRADD, RIP, TRAF-2, NIK або p65-субодиницею NK-KB;

(2) RAP-2 здатний забезпечувати гіперфосфорилювання c-Jun без зміни активності кінази JNK;

(3) RAP-2, як було встановлено в делеційному аналізі, не залежить ні від «домену загибелі» RIP, ні від кіназної активності RIP з точки зору зв'язування з RIP;

(4) засновуючись на згаданому вище делеційному аналізі, сайт зв'язування RAP-2 з RIP був звужений до N-кінцевої дільниці довжиною приблизно в 200 амінокислот;

(5) RAP-2 зв'язується з NIK в трансфорованих клітинах ссавців, але не дріжджів.

Таким чином, з точки зору перерахованого вище RAP-2, мабуть, є високо специфічним білком, що RIP-зв'язується, а, отже, і модулятором/медіатором RIP, тому він, певно, залучений в опосередковані чинником RIP внутрішньоклітинні сигнальні механізми.

В світлі зазначеного вище представляється, що RAP-2 бере участь в модуляції/опосередкуванні активності RIP. Всередині клітин це пов'язано з участю RIP в механізмі контролю здатності до виживання клітин (активація NK-KB, можливо через взаємодію з TRAF2) і з механізмах загибелі клітин і запалень (незалежно через «згубну домену» цього білка або через взаємодію з іншими білками, такими як MORT-1, TRADD, p55-R, FAS-R і пов'язаними з ними протеазами, такими як MACH, Mch4, G1 і подібними). Вірогідні шляхи, по яким RAP-2 здатний модулювати/опосередковувати активність RIP, детально обговорювалися в даному тексті вище. Наприклад, взаємодія RAP-2/RIP може зумовлювати посилення механізмів або загибелі клітин, або виживання клітин, або ж воно може зумовлювати придушення механізмів або загибелі клітин, або виживання клітин, при тому, що таке посилення або придушення, мабуть, залежить від відносних рівнів активності інших учасників цих двох протилежних по дії клітинних механізмів. Також RAP-2 здатний виконувати

функції «депо»-білка, забезпечуючи агрегації групи молекул RIP і інших RIP - або білків, що KAP2-зв'язуються, при тому, що така агрегація потім може функціонувати або в напрямку загибелі клітин, або виживання клітин (або в обох напрямках) в залежності від співвідношення кількості і (або) активності інших учасників цих клітинних механізмів.

#### Приклад 11

##### Отримання поліклональних антитіл до RAP-2

Початково кроликам підшкірно ін'єктували по 5 мкг чистих препаратів RAP-2, емульгованого в повному ад'юванті Фройнда. Через 3 тижні ін'єкції повторювали, вводячи підшкірно по 5мкг препарати RAP-2 в неповному ад'юванті Фройнда. Дві додаткові ін'єкції RAP-2 у вигляді розчину в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) проводили з 10-денним інтервалом. Через 10 днів після останньої імунізації у кроликів брали кров. Рівень антитіл, що формуються визначали в радіоімунологічному тесті. RAP-2, помічений <sup>125</sup>I, змішували в різному розведенні (1:50, 1:500, 1:5000 і 1:50000) з кролячою сироваткою. Суспензію кульок з агарози з белком-G (20мкл: Phamacia) додавали при загальному об'ємі в 200мкл. Суміш витримували при кімнатній температурі протягом 1 години і потім кульки тричі промивали і підраховували пов'язану з ними радіоактивність. Як негативний контроль використали кролячу антисироватку до лептину людини. Титр антисироватки RAP-2 визначали, порівнюючи з показником негативного контролю.

#### Приклад 12

##### Отримання моноклональних антитіл до RAP-2

Спочатку самиць мишей лінії BALB/c (у віці 3 місяців) ін'єктували 2мкг очищеного RAP-2 у вигляді емульсії в повному ад'юванті Фройнда, а через 3 тижні вводили його підшкірно в неповному ад'юванті Фройнда. З 10-денним інтервалом проводили три додаткові ін'єкції - підшкірно в ФСБ. Остаточний бустинг здійснювали шляхом внутрішньобрюшинних ін'єкцій за 3-4 дні до злиття клітин тієї миші, яка характеризувалася найвищим титром, виходячи з даних IRIA (див. нижче). Злиття клітин здійснювали між мієломними клітинами NSO/1 і лімфоцитами, приготованими на матеріалі тканин селезінки і лімфатичних вузлів тварини. Гібридизувавши клітини розподіляли на мікротитрувальних планшетах і отримані гібридоми відбирали в культуральному середовищі DMEM, доповненому селективною сумішшю HAT і 15% коблячої сироватки. Гібридами, для яких встановлювалося вироблення антитіл, специфічних у відношенні RAP-2, субклонували при обмежуючому розведенні і ін'єктували мишам лінії BALB/c, яким заздалегідь вводили пристан з метою індукції вироблення асцитної рідини. Ізотипи антитіл, що отримуються, визначали з використанням доступного на комерційній основі набору реактивів для ТИФА - ELISA kit (Amersham, Англія).

Скрінінг гібридом, що виробляють моноклональні антитіла до RAP-2, здійснювали таким чином. Гібридомні надосадочні фракції тестували на присутність в них антитіл, специфічних до RAP-2, за допомогою зверненого твердофазного радіоімунологічного тесту (IRIA). Планшети для ТИФА (Dynatech Lab., Alexandria, VA) покривали очищеним в Talon IL-ISBPα-Hisg (10мкг/мл, 100мкл на лунку). Після інкубації протягом ночі при 4°C планшети промивали 2 рази в ФСБ, що містить бичачий сироваточний альбумін (0,5%) і Твін-20 (0,05%) і блокували в промиваючому розчині протягом принаймні 2 годин при 37°C. Додавали надосадочні фракції гібридомних культур (100мкл на 1 лунка) і планшети інкубували протягом 4 годин при 37°C. Планшети потім тричі промивали і додавали кон'югат козячих антимишачих антитіл з пероксидазою хрину (HPR: Jackson Lab; розведення 1:10000, 100мкл на лунку) на 2 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 4 рази і індукували фарбування додаванням як субстрат 2,2'-азино-біс-(С-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (Sigma) з перекисом водню. Для зчитування планшетів використали автоматичний сканер для ТИФА. Зразки, оптична щільність яких була принаймні в 5 раз вище в порівнянні з негативним контролем, розглядалися як позитивні.

Антитіла до RAP-2 можуть бути використані для цілей очищення RAP-2 в методі афінної хроматографії.

#### Приклад 13

##### Тест ТИФА

Мікротитрувальні планшети (Dynatech або Maxisorb; Nunc) покривали моноклональним антитілом, специфічним у відношенні RAP-2 (імуноглобуліни з безсироваточної гібридомної надосадочної фракції або асцитної рідини) протягом ночі при 4°C. Планшети потім промивали в ФСБ з додаванням бичачого сироваточного альбуміну (0,5%) і Твін-20 (0,05%) і блокували тим же самим розчином протягом принаймні 2 годин при 37°C. Зразки, що аналізуються, розводили в блокуючому розчині і додавали в лунки (по 100мкл на лунку) протягом 4 годин при 37°C. Потім планшети тричі промивали в ФСБ, що містить Твін-20 (0,05%) з подальшим додаванням кролячої анти-KAP2 сироватки (1:1000, 100мкл на лунку) для подальшої інкубації протягом ночі при 4°C. Після цього планшети тричі промивали і додавали кон'югат козячих антимишачих антитіл з пероксидазою хрину (HPR: Jackson Lab; розведення 1:10000, 100мкл на лунку) на 2 години при кімнатній температурі. Планшети промивали 4 рази і індукували фарбування додаванням як субстрат 2,2'-азино-біс-(С-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (Sigma) з перекисом водню. Для зчитування планшетів використали автоматичний сканер для ТИФА.

Маючи тепер повний опис даного винаходу, фахівцем в даній області техніки має бути зрозумілим, що те ж саме може бути здійснене в широкому колі еквівалентних параметрів, концентрацій і умов без відхилення від духу і букви даного винаходу і без проведення додаткових сторонніх експериментів.

Оскільки даний винахід був описаний в зв'язку з його конкретними варіантами, то має бути зрозумілим, що в нього можуть бути внесені додаткові модифікації. Дана заявка покликана охопити будь-які зміни, застосування або пристосування даного винаходу з урахуванням принципових аспектів даного винаходу, а також включаючи такі відхилення від даної заявки, які можуть виявитися на практиці в даній області техніки, до якої відноситься даний винахід, і він може бути застосованим в зв'язку з його базовими параметрами, описаними, зокрема, в наведеній нижче формулі винаходу.

Всі джерела, що цитувалися в даному тексті, включаючи журнальні статті або тези, опубліковані або подані заявки на американські або зарубіжні патенти, видані патенти США або інших країн, або будь-які інші джерела в повному своєму обсязі включені тут тільки для зведення у вигляді бібліографічних посилань,

включаючи всі їх, таблиці, фігури і цитати, що входять в дані джерела, що цитуються. Крім того, повний зміст джерел, що цитуються також наводиться тут виключно для зведення.

Звернення до відомих методичних етапів, елементів стандартних методів, відомих методів або стандартним методам ні в якій мірі не є допущенням того, що будь-який з аспектів, описів або варіантів даного винаходу були вже заявлені, представлений або підтверджений в даній області техніки раніше.

Попередній опис конкретних варіантів в повному своєму об'ємі покликаний лише освітити загальне значення даного винаходу, який із застосуванням відомого фахівцям в даній області техніки (включаючи інформацію з різних друкарських джерел, що цитувалися в даному тесті) може бути легко модифіковано і (або) адаптовано для цілей різних шляхів використання його конкретних варіантів, не проводячи при цьому додаткових експериментів, без відхилення від базової концепції даного винаходу. Отже, таке пристосування і такі модифікації попадають в коло еквівалентів заявлених тут варіантів, засновуючись на зроблених тут описах і керівництві. Також має бути зрозумілим, що термінологія, що використовувалася тут, враховували цілі справжнього опису і не служила для будь-якого обмеження, тобто така термінологія даної заявки повинна інтерпретуватися фахівцями в даній області техніки в світлі описів і керівництва, представлених даною заявкою в поєднанні з тим, що відомо фахівцям в даній області техніки.

#### Бібліографія REFERENCES

- Anemri, E.S. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:4312-4317.  
Barinaga, M. (1993) Science 262:1512-1514.  
Beg. A.A. and Baltimore. D. Science 274:782-784.  
Beidler, J. et al., (1995) J. Biol. Chem, 270:16526-16528.  
Bcrger, J. et al. (1988) Gene 66:1-10.  
Beutler, B. and Cerami, C (1987) NEJM: 316:379-385.  
Bigda, J. et al. (1994) J. Exp. Med. 180:445-460.  
Boldin, M.P. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:337-341.  
Boldin, M.P. et al. (1995b) J. Biol. Chem. 270:7795-7798.  
Boldin, M.P. et al. (1996) Cell 85:803-815.  
Brakebusch, C et al. (1992) EMBO J., 11:943-950.  
Brockhaus, M. et al. (1990) Proc. Nad. Acad. Sci. USA, 87:3127-3131.  
Cantor, G.H. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10932-6.  
Cerreti, D.P. el al. (1992) Science 256:97-100.  
Chen, C.J. et al. (1992) Aim. N.Y. Acad. Sci. 660:271-3.  
Chinnaiyan et al. (1995) Cell 81:505-512.  
Chinnaiyan et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:4961-4965.  
Cifone, M.G. et al. (1995) EMBO J. 14:5859-5868.  
Clement, M.V. et at. (1994) J, Exp. Med. 180:557-567.  
Crisell, P. et al., (1993) Nucleic Acids Res. (England) 21 (22):5251-5.  
Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, IA, Struhl, K., Albright, L.M., Coen, Varki, A., eds.), (1994) pp.8.1.1-8.1.6 and 16:7-16.7.8, Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.  
Dirks, W., et al, (1993) Gene 128:247-249,  
Durfee, T. et al. (1993) Genes Dev. 7:555-569.  
Eischen. CM. et al. (1994) J. Immunol. 153:1947-1954.  
Ellis, H.M. et al. (1986) Cell 44:817-829.  
Enari. M. et al. (1995) Nature 375:78-81.  
Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chum., 265:1531-1536.  
Faucet, C et al. (1995) EMBO J. 14:1914-1922.  
Fernandes-Ainemri, T. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:30761-30764.  
Fernandes-Alnemri, T. et al. (1995) Cancer Res. 55:2737-2742.  
Fernandes-Alnemri. T. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7464-7469.  
Field, J. et al]. (1988) Moř. Cell Biol. 8.-2159-2165.  
Fields, S. and Song, O. (1989) Nature, 340:245-246.  
Frangioni, J.V. andNeel, B.G. (1993) Anal. Biochem. 210:179-187.  
Geysen. H.M. (1985) Immunol. Today 6:364-369.  
Geysen, H.M. et al, (1987) J. Immunol. Mem. 102:259-274.  
Gossen, M. and Boujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551.  
Grell. M. et al. (1994) Eur. J. Immunol, 24:2563-2566.  
Heller, R.A. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6151-6155.  
Henkart, P.A. (1996) Immunity 4:195-201.  
Hohmalm, H.-P. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264:14927-14934.  
Howard, AD. et al. (1991) J. Immune]. 147:2964-2969.  
Hsu, H. et al. (1995) Cell 81:495-504. Hsu, H. et al. (1996) Cell 84:299-308.  
Itoh, N. et al. (1991) Cell 66:233.  
Itoh, N. andNagata, S. (1993) J. Biol. Chem. 268:10932-7.  
Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) J. Biol. Chem. 268:24515-8.  
Kamcns, J. et al. (1995) J. Bial. Chem. 270:15250-15256.  
Kaufmam, S.H. (1989) Cancer Res. 49:5870-5878.  
Kaufaiann, S.H. (1993) Cancer Res. 53:3976-3985.  
Kischkel, F.C. et al. (1995) EMBO J. 14:5579-5588.  
Koizumi, M. et al. (1993) Biol. Pham. Bull (Japan) 16 (9):879-83.  
Kumar, S. et al. (1994) Genes Dev. 8:1613-1626.

- Kumar, S. (1995) Trends Biochem Sci. 20:198-202.
- Lazebnik, Y.A. et al. (1994) Nature 371:346-347.
- Leithauser, F. et al. (1993) Lab Invest. 69:415-429.
- Li, Y. et al. (1998) Mol Cell Biol 18:1601-1610.
- Loetscher, H. et al. (1990) Cell. 61:351-359.
- Los, M. et al. (1995) Nature 375:81-83.
- Madden, S.L. et al. (1996) Cancer Res 56:5384-5390.
- Malinin, N.L. et al. (1997) Nature 385:540-544.
- Martin, S.J. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:6425-6428.
- Mashima, T. et al. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:907-915.
- Miller, B.E. et al. (1995) J. Immunol. 154:1331-1338.
- Milligan, C.E. et al. (1995) Neuron 15:385-393.
- Miura, M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8318-8322.
- Munday, N.A. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:15870-15876.
- Muranishi, S. et al. (1991) Phann. Research 8:649.
- Musti AM, et al. (1997) Science 197 275:400-402.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995) Science 267,1449-1456.
- Natoli, G. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272,26079-26082.
- Nicholson, D.W. et al. (1995) Nature 376:37-43.
- Nophar, Y. et al. (1990) EMBO J., 9:3269-3278.
- Piquet, P.F. et al. (1987) J. Exp. Med., 166:1280-89.
- Ray et al. (1992) Cell 69:597-604.
- Ruggiero, V. et al. (1987) Cell Immunol. 107:317-325.
- Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schall, T.J. et al. (1990) Cell, 61:361-370.
- Schlegel, et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:1841-1844.
- Schukse-Osthoff, K. et al. (1994) EMBO J. 13:4587-4596.
- Shimayama, T. et al., (1993) Nucleic Acids Symp. Ser. 29:177-8.
- Shore, S.K. et al. (1993) Oncogene 8:3183-8.
- Sleath, P.R. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:14526-14528.
- Smith, C.A. et al. (1990) Science, 248:1019-1023.
- Song, H.Y. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:22492-22495.
- Srinivasuja, S.M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14486-14491.
- Stanger, B.Z. et al. (1995) Cell 81:513-523.
- Tarraglia, L. A. et al. (1993) Cell, 74:845-853.
- Tewari, M. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:3255-3260.
- Tewari, M. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:18738-18741.
- Tewari, M. et al. (1995b) Cell 81:1-20.
- Thomberry, N.A. et al. (1992) Nature 356:768-774.
- Thombeiry, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33:3934-3940.
- Tracey, J.T. et al. (1987) Nature, 330:662-664.
- Van Antwerp, D.J. et al. (1996) Science 274:787-789.
- Vandenabeele, P. et al. (1995) Trends Cell Biol. 5:392-400.
- Vassalli, P. (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:411-452.
- Wallach, D. (1984) J. Immunol. 132:2464-9.
- Wallach, D. (1986) In: Interferon 7 (Jon Grosser, ed.), pp.83-122, Academic Press, London.
- Wallach, D. et al. (1994) Cytokine 6:556.
- Wang, L. et al. (1994) Cell 78:739-750.
- Wang, C.-Y. et al., (1996) Science 274:784-787.
- Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) Nature, 356:314-317.
- Watanabe, F. R. et al. (1992) J. Immunol. 148:1274-1279.
- Weitzen, M. et al. (1980) J. Immunol. 125:719-724.
- Wilks, A.F. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1603-1607.
- Wong et al. (1994) J. Immunol. 152:1751-1755.
- Xue, D. et al. (1995) Nature 377:248-251.
- Yamaoka S, et al. (1998) Cell 93:1231-1240.
- Yonehara, S. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:1747-1756.
- Yuan, J. et al. (1993) Cell 75:641-652.
- Zaccharia, S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 203:353-357.
- Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) Nature (England) 365:448-51.
- СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> WALLACH David

KOVALENKO Andrei Yeda Res. & Develop. Co. Ltd.

<120> Модулятори функцій рецепторів родини рецепторів TNF/NGF і інших біл

<130> рецептори TNF/NGF

<140>

<141>

<150> 123758

<151> 19 березня 1998 р.

<150> 126024

<151> 1 вересня 1998 р.

<160> 3

<170> Patentin Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2009

<212> ДНК

<213> людина

<400> 1

```
gaagattcca ttgtgggcct gsgaggccta gcaagggcgg accgcgaaac tgggactttt 60
ttcggagcgc cggggcccta ccagcgttca cagtccgccg ctcccacctt tctcacgtct 120
gaccggactct gctgacagcc ctggccctgt tggatgaata ggcacctctg gaagagccaa 180
ctgtgtgaga tggtgacagc cagtgggtgg ccggcagcag atcaggacgt actgggcgaa 240
gagtctcttc tggggaagcc agccatgctg caccctgcctt cagaacaggg cgctcctgag 300
acctccagc gctgcctgga ggaatatcaa gactcccgag atgccatccg gcagagcaca 360
cagattctgc gggagcgcct cgaaggagctt ctgcatttcc aagccagcca gaggagagag 420
aaggagttcc tcatgtgcaa gtccaggag gccaggaaac tggtgagag actcggcctg 480
gagaagctcg atctgaagag gcagaaggag caggctctgc ggaaggctgg gcacctgaag 540
```

agatgccagc agcagatggc tgaggacaag gccctctgtga aagcccaggt gacgtccttg 600  
 ctccggggagc tgcaggagag ccagagtcgc ttggaggctg cactaaggga atgccagggt 660  
 ctggagggtc gggcccgggc ggccagcgag cagcgcggc agctggagag tgagcgcgag 720  
 gcgctgcagc agcagcacag cgtgcagggt gacdagctgc gcatgcaggg ccagagcggtg 780  
 gaggccgcgc tccgcatgga gcgccaggcc gccctcggagg agaagaggaa gctggcccag 840  
 ttgcagggtg cctatcaccg gctcttccaa gaatacgaca accacatcaa ggcagcggtg 900  
 gtgggcagtg agcgggaagc aggaatgcag ctggaagatc tcaaacagca gctccagcag 960  
 gccgagggag ccctgggtgc caaaccaggag gtgatcgata agctgaaggga ggaggccgag 1020  
 cagcacaaga ttgtgatgga gaccgttccg gtgctgaagg cccaggcgga tatctacaag 1080

gggacttcc aggctgagag gcaggcccgg gagaagctgg ccgagaagaa ggaagctcctg 1140  
 caggagcagc tggagcagct gcagaggag tacagcaaac tgaaggccag ctgtcaggag 1200  
 tcggccaggga tcgaggacat gagggaagcgg catgtcgagg tctcccaggc ccccttgccc 1260  
 ccggccctcg cctacctct cctccctcg gccctgcaca gccagaggag gagccccccc 1320  
 gaggagccac ctgacttctg ctgtcccaa tgccagtatc agggccctga tatggacacc 1380  
 ctgcagatgc atgtcatgga gtgcattgag tagggccggc agtgcaagg ccaactgcctg 1440  
 ccgaggacgt gcccgggacc gtgcagtctg cgctttcctc tcccgcctgc ctgcccagg 1500  
 atgaagggtc ggggtggcac aactgggatg ccacctggag ccccccagg gagctggcgg 1560  
 cggcacctta cgcttcagct gttgattccg ctggctccct cttttgggt agatgcggcc 1620  
 ccgatcaggc ctgactcgct gctcttttg tcccttctg tctgctcgaa ccaactgcct 1680  
 cgggctaat cctccctctt cctccaccgg gcactgggga agtcaagaat ggggcctggg 1740  
 gctctcaggg agaactgctt cccctggcag agctgggtgg cagctcttcc tcccaccgga 1800  
 caccgacccg ccgcgtgctg tgcctggga gtgctgcct cttaaccatgc acacgggtgc 1860  
 tctccttttg ggctgcagc tattccattt tgcagccaga ccgatgtgta tttaaccagt 1920  
 cactattgat ggacatttgg gttgtttccc atctttttgt taccatmaat artggcmtag 1980  
 \_akaaaaatcc ttgtgcatta aaaaaaaa 2009

<210> 2

<211> 2034

<212> ДНК

<213> людина

<400> 2

ttctactcct cctcctcct cactgcgggg tctgacccta ctccttgtgt gaggactcct 60  
 ctagttcaga gacatatctt gttcaccaaa cttgactgcg ccttatcgag gtcgttaaat 120  
 tcttcggaaa tgcctcacat atagtgtggc agctagccct tgcctgttg gatgaatagg 180  
 caccctctga agagccaact gtgtgagatg gtgcagccca ggggtggccc ggcagcagat 240  
 caggacgtac tgggcgaaga gtctcctctg gggaaqccag ccattgctgca cctgcccctca 300  
 gaacaggggc ctcctgagac cctccagcgc tgcctgggag gagaatcaa agctccgaga 360  
 tgcgatcccg cagtagcaac cagattcttg cgggagctgc cgaagggagc tttctgcatt 420

```

ttccaagcca gccagaggga ggagaaggag ttccctcatgt gcaagttcca ggaggccagg 480
aaactggtgg agagactcgg cctggagaag ctccatctga agaggcagaa ggagcaggct 540
ctgcgggagg tggagcaccct gaagagatgc cagcagcaga tggctgagga caaggccctct 600
gtgaaagccc aggtgacgtc cttgctcggg gaggctgagg agagccagag tcgcttgagg 660
gctgccacta aggaatgccg ggtctcggag ggtcggggccc ggcgggccag cgagcaggcg 720
cggcagctgg agagtgcagg cggggcgtcg cagcagcagc acagcgtgca ggtggaccag 780
ctgcgcagtc agggccagag cgtggaggcc gcgctccgca tggagcgcga ggccgcctcg 840
gaggagagga gaaagctggc ccagttgcag gtggccctat accagctctt ccaagaaac 900
gacaaaccaca tcaagagcag cgtggtgggc agtgagcggg agcgagggaat gcagctggaa 960
gatctcaaac agcagctcca gcaggccgag gaggccctgg tggccaaaca ggaggtgac 1020
gataagctga aggaggaggc cggagcagc aagattgtga tggagaccgt tccggtgctg 1080
aaggcccgag cggatatcta caaggcgagc ttccaggctg agaggcaggc ccgggagaa 1140
ctggccgaga aagaggagct cctgcaggag cagctggagc agctgcagag ggagtcacag 1200
aaactgaagg ccagctgtca gtagtcggcc aggatcgagg acatgaggaa gcggcatgtc 1260
gaggtctccc agggccccc ccccccggc cctgcctacc tctcctctcc cctggccctg 1320
cccagccaga ggaggagccc ccccaggag ccacctgact tctgctgtcc caagtgcag 1380
tatcaggccc ctgatatgga caccctgcag atacatgtca tggagtgcat tgaatagggc 1440
cggcagatgc aaggccactg cctgccgagg acgtgcccgg gaccgtgcag tctgccttt 1500
cctctcccgc ctgcctagcc caggatgaag ggctgggtgg ccacaactgg gatgccacct 1560
ggagccccc caggagagct gccgcggcac cttacgcttc agctgttgat tccgctggct 1620
ccctcttttg ggttagatgc ggcccagatc aggcctgact cgtgctctt tttgttccc 1680
ttgtctgct cgaaccactt gcctcgggct aatccctccc tcttctcca cccggcactg 1740
gggaagtcaa gaatgggggc tgggctcttc agggagaaact gcttcccctg gcagagctgg 1800
gtggcagctc ttctccccc cggacaccga cccgccgct gctgtgccc ggagtgctg 1860
ccctctaac atgcacacgg gtgctctcct tttgggctgc atgctatcc attttgacg 1920
cagaccgat tgtatttaac cagtcaactat tgatggacat ttgggtgtt tcccattct 1980
ttgttaccat maataxtggc mtagaakaaa atccttgtgc attaaaaaaa aaaa 2034

```

<210> 3

<211> 2116

<212> ДНК

<213> людина

<400> 3

```

gccacgaagg ccagacttt gaccgttctt caccaccact ccagcctcct cctgtgaact 60
cactgaccac cgagaacaga ttccactctt taccattcag tctcaccag atgcccaata 120
ccaatggaa gatttggcac agtccacttt cctgtgcagc coagttctga atggaaagac 180
taaacactgc acccgctcaa gagagtcac ccttggccat gcctcctggg aactcacatg 240
gtctagaagt gggctcattg gctgaagtta aggagaaccc tctttctcat ggggtaatcc 300
gttggatcgg tcagccacca ggaactgaat aagtgtcgc tggactggaa ctggaagatg 360
agtgtgcagg ctgtacggat ggaaccttca gaggcactcg gtatttcacc tgtgcccctg 420
agaaggcgct gtttgtgaaa ctgaagagct gcaggccctg ctctagggtt gcattcattg 480
agccgggttc caatcaagat tgagcgctgt aactctttag cttttggagg ctacttaagt 540
gaagtatgta aaaaaatact caccacaaaa tggaaaaaga argcttggag ataactgatg 600
gggaaagaag aagggtctcc aagggtcatt acaattcttg ktacttagac tcaaccttat 660
tctkgcttat ttkgctttta gttctgttct nggacactgg tgttacttta gaccccaag 720
aaaaagaaac gatgttagaa tattwtwkwg mmaccaca gaacttgagg acagaaattg 780
taactcctct gagaatatat ggaatatgtg gtgccacaaa aattatgaaa ctgaggaaaa 840
tacttgaaaa ggtggaggct gcattcaggat ttacctctga agaaaaagat cctgaggaaat 900
tcttgaatat tctgtttcat catattttta gggtagaacc tttgctaaaa ataagatcag 960
cagggtcaaaa ggtacaaagt tgttacttct atcaaatrtt tatggaaaaa aatgagaaa 1020
ttggcgttcc cacaaattcag cagttgttag aatggctttt tatcaacagt aacctgaaat 1080
ttgcagaggg accatcatgt ctgattatc agatgcctcg atttggaaaa gacttttaac 1140
tatttaaaaa atttttctct ctctggaatt agatataca gatttacttg aagacacccc 1200
agacagtgcg ggaatatgtg agggcttgca atgtatgagt gtaagaatgc tacgacgac 1260
cggacaccag ctggaaaaaa aagcagtttt gtaaaacctg caacactcaa gtccaccttc 1320
atccgaagag gctgaatcat aaatataacc cagtgtcact tcccaaaagc ttaccccgac 1380
tgggagattg gagacacggc tgcattccct gccagaatat ggagttaatt gctgttctct 1440
gcatagaaac aagccactat gttgcttttg tgaagratgg gaaggacgat tctgcctggc 1500
tcttcttttg acagcatggc cgaatcggga tgggtgtcag aatggctcaa cattccccca 1560
agtcmmccmt gscacagaag taggagagta cttggaaagt gtctcctgga agaccctgga 1620
wtcccttga ctcccaggag aatcccaagg ctgtgcacga agactgcttt gtgatgccat 1680
atatgtgcca tgtacccaga gtcccaaat gagtgtgtac aaataactgg gggtcacatg 1740
gaaagccaa gaaactggas ggcagagtc ctacacgttc atcttatctg gagctggcag 1800
tctgtttcac ggtccatgc cggcaatgga tgtctttgtg gtgatgatcc ttcaaaaaag 1860
gatgcctctg tttaaaaaa aattgctttt gtgtccctga agtatataat aagaagcatt 1920
ttgcactcta gaaagtatgt ttgtgttggg tttttaagaa gtctaaatga agttattaat 1980
acctgaagct ttaagttaa gtcattgac atatgatatt tttggaagca tacaatttta 2040
atttgggaag ttaaaagcct cttttagtc attgagaatg taaataaatg tgtcttcttt 2100
atggaaaaaa aaaaaa
2116

```