

Настоящее изобретение относится к рецепторам, принадлежащим к суперсемейству рецепторов TNF/NGF, и к регулированию их биологических функций. К суперсемейству рецепторов TNF/NGF принадлежат рецепторы факторов роста некроза опухолей p55- и p75 (TNF-R), рецептор лиганда FAS (называемый также FAS/APO1 или FAS-R, и обозначаемый далее FAS-R) и другие рецепторы. Более конкретно, настоящее изобретение относится к новым белкам, которые связываются с внутриклеточными доменами (1C) p55- и p75-TNF-R и Fas-R, (обозначаемыми далее p551C, p751C и Fas=1C, соответственно), и которые обладают способностью модулировать функции p55- и p75-TNF-рецепторов, а также Fas-рецептора. Одним из таких белков, способных связываться с p551C интактного p55-TNF-R, является сам p551C в виде молекулы p551C или ее части, например, так называемого "домена смерти" p551C. Таким образом, настоящее изобретение также относится к новым TNF-ассоциированным эффектам, которые могут быть индуцированы в клетках внутриклеточным доменом p55-TNF (p551C) или его частью лиганд (TNF)-независимым образом. Кроме того, настоящее изобретение относится к получению и использованию указанных новых белков, связывающихся с p55- и p75-TNF-R, и белков, связывающихся с Fas-R, которые в настоящем описании именуются p551C-, p751C- и Fas-1C-связывающимися белками.

В другом аспекте, настоящее изобретение также относится к новым растворимым олигомерным TNF-R, олигомерным FAS-R и олигомерным рецепторам, представляющим собой смесь TNF-R и FAS-R; к использованию этих рецепторов, и к способам их получения.

Фактор некроза опухолей (TNF- α) и лимфотоксин (TNF- β) (обозначаемые далее TNF- α и TNF- β , соответственно) представляют собой многофункциональные цитокины, образуемые, главным образом, мононуклеарными фагоцитами, и обладающие множественным действием на клетку [Wallach, D. (1986), в Interferon 7 (Jon Gresser, ed.), pp.83-122, Academic Press, London; и Beutler S Cerami (1987)]. Действие обоих указанных цитокинов, TNF- α и TNF- β инициируется посредством их связывания со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Очевидно, что некоторые действия этих цитокинов благоприятно влияют на организм, то есть, они могут, например, разрушать опухолевые или вирус-инфицированные клетки и усиливать антибактериальную активность гранулоцитов. В этом случае, TNF обеспечивают защиту организма от опухолей и инфекционных агентов, а также способствует заживлению ран. Таким образом, TNF может быть использован в качестве противоопухолевого агента, который связывается со своими рецепторами на поверхности опухолевых клеток и тем самым инициирует события, приводящие к гибели этих опухолевых клеток. TNF может быть также использован в качестве противоионфекционного средства.

Однако, оба эти фактора, т.е., TNF- α и TNF- β обладают также неблагоприятным действием. Было показано, что сверхпродукция TNF- α может играть важную роль в патогенезе некоторых заболеваний. Так, например, в настоящее время уже известно, что действие TNF- α , главным образом на сосудистую сеть органа, вызывает симптомы септического шока [Tracey et al., 1986]. При некоторых заболеваниях, TNF может также вызывать резкое снижение массы тела (кахексию) в результате подавления активности адипоцитов и провоцирования анорексии, а поэтому фактор некроза опухолей TNF- α имеет также название кахексии). Сообщалось также, что TNF опосредует разрушение тканей при ревматических заболеваниях [Beutler S Cerami, 1987], и является главным медиатором отторжения, наблюдаемого в реакциях "трансплантат против хозяина" [Piquet и др. 1987]. Кроме того, известно, что TNF участвует в процессе воспаления и опосредует многие другие заболевания.

Два отличающихся друг от друга и независимо экспрессируемых рецептора p55- и p75-TNF-R, которые специфически связываются с TNF- α и TNF- β инициируют и/или опосредуют биологические функции вышеуказанных TNF. Эти два рецептора имеют структурно отличающиеся внутриклеточные домены, что позволяет предположить, что они передают разные сигналы [см., Hohnman и др., 1989; Engelmann и др., 1990; Rockhaus и др., 1990; Leotscher и др., 1990; Schall и др., 1990; Hophar и др., 1990; Smith и др., 1990; и Heller и др., 1990]. Однако, клеточные механизмы, например, различные белки и возможно другие факторы, участвующие в передаче внутриклеточного сигнала p55- и p75-TNF-R, пока еще не выявлены (ниже впервые описываются новые белки, способные связываться с p751C и p551C). Но именно такая передача сигналов, которая происходит обычно после связывания лиганда (т.е. TNF- α или TNF- β) с рецептором, ответственна за инициацию каскада реакций, которые, в конце концов, приводят к наблюдаемому клеточному ответу на TNF.

Что касается вышеупомянутого цитоидного действия TNF, то в большинстве клеток, изученных до настоящего времени, это действие стимулируется, главным образом, рецептором p55-TNF. Антитела против внеклеточного домена (домен, связывающийся с лигандом) p55-TNF-R могут сами по себе быть стимуляторами цитоидного эффекта [см., EP 412486], который коррелирует с эффективностью перекрестного связывания рецептора с антителами, и который является, очевидно, первой стадией процесса передачи внутриклеточного сигнала. Кроме того, исследования, проведенные методом мутаций [Brackebusch и др., 1992; Tartaglia и др., 1993], показали, что биологическая функция p55-TNF-R зависит от целостности его внеклеточного домена, что дает основания предположить, что инициация трансдукции внутриклеточного сигнала, индуцирующая цитоидное действие TNF, происходит в результате объединения двух или нескольких внутриклеточных доменов p55-TNF-R. Кроме того, TNF (α и β) присутствует в виде гомотримера, и, как было предположено, индуцирует p55-TNF-R-опосредованную передачу внутриклеточных сигналов благодаря своей способности к связыванию и перекрестному сшиванию с рецепторными молекулами, т.е., к созданию агрегации с рецептором. Ниже, в настоящей заявке будет описано, каким образом p551C и p55DD могут ассоциироваться друг с другом, и индуцировать лиганд-независимым способом, TNF-ассоциированные эффекты в клетках.

Другим членом суперсемейства TNF/NGF-рецепторов является рецептор FAS (FAS-R), который называют также Fas-антигеном, и который представляет собой белок клеточной поверхности, экспрессируемый в различных тканях, и обладающий гомологией с рядом рецепторов клеточной поверхности, включая TNF-R и NGF-R, FAS-R опосредует гибель клеток по типу апоптоза [Iton и др., 1991], и служит, очевидно, в качестве негативного селектора аутореактивных Т-клеток, т.е., в процессе созревания Т-клеток, FAS-R опосредует

апоптоз Т-клеток, распознающих аутоантигены. Было также обнаружено, что мутации в гене FAS-R (1pr) вызывают нарушение лимфопролиферации у мышей, которые имеют сходную с человеческой картину такого аутоиммунного заболевания, как системная красная волчанка (SLE) [Watanabe-Fukunada и др., 1992]. Лигандом для FAS-R является, очевидно, молекула, ассоциируемая с клеточной поверхностью, и несомая, среди прочих, Т-клетками-киллерами (или цитотоксическими Т-лимфоцитами - CTL), а поэтому, когда такие CTL контактируют с клетками, несущими FAS-R, они способны индуцировать апоптоз FAS-R-несущих клеток. Кроме того, было получено моноклональное антитело со специфичностью к FAS-R, которое обладало способностью индуцировать апоптоз клеток, несущих FAS-R, включая мышинные клетки, трансформированные кДНК, кодирующей FAS-R человека [Iton и др., 1991].

Было также обнаружено, что помимо Т-лимфоцитов, имеются и другие нормальные клетки, которые экспрессируют FAS-R на своей поверхности, и которые могут быть уничтожены путем стимуляции этого рецептора. Было высказано предположение, что, нерегулируемая индукция такого процесса цитолиза приводит, при некоторых заболеваниях, к разрушению тканей организма, например, к деструкции клеток печени при остром гепатите. Поэтому, разработка способов ограничения цитотоксической активности FAS-R может привести к получению методов терапии, имеющих важное значение.

И наоборот, поскольку было также обнаружено, что некоторые злокачественные клетки и ВИЧ-инфицированные клетки несут FAS-R на своей поверхности, то антитела против FAS-R или FAS-R-лиганда могут быть использованы для стимуляции FAS-R-опосредованных цитотоксических эффектов, что позволит получить средство уничтожения указанных злокачественных или ВИЧ-инфицированных клеток (см., Iton и др., 1991). Кроме того, получение других способов усиления цитотоксической активности FAS-R может также иметь важное терапевтическое значение.

Уже давно назрела необходимость в получении способа модуляции клеточного ответа к TNF (α или β) FAS-R-лиганду. Так, например, в патологических процессах, упомянутых выше, где происходит сверхсинтез TNF или FAS-R-лиганда, желательно ингибировать TNF- или FAS-R-лиганд-индуцированные цитокидные эффекты; а в других ситуациях, например, при заживлении ран, желательно стимулировать действие TNF, либо, в случае опухолевых или ВИЧ-инфицированных клеток, желательно стимулировать FAS-R-опосредованный ответ.

Авторами настоящего изобретения было разработано несколько способов [см., например, заявку на Европейский патент EP 186833, EP 308078, EP 398327 и EP 412486] регулирования нежелательных эффектов TNF путем ингибирования связывания TNF с его рецепторами с помощью антител против TNF или путем использования растворимых TNF-рецепторов (являющихся, в основном, растворимыми внеклеточными доменами рецепторов) для конкурентного связывания TNF со TNF-рецепторами, ассоциированными с клеточной поверхностью. Кроме того, исходя из того, что для получения TNF-индуцированного клеточного ответа необходимо связывание TNF со своими рецепторами, авторами настоящего изобретения были разработаны способы [см., например EPO 568925] регулирования действия TNF путем модулирования активности TNF-рецепторов. В частности, [в EPO № 568925] описан способ модуляции трансдукции сигнала и/или гидролиза в TNF-R, в результате чего пептиды или другие молекулы могут взаимодействовать либо с самим рецептором, либо с эффекторными белками, взаимодействующими с рецептором, осуществляя тем самым, модуляцию нормального функционирования TNF-R. [В EPO 568925] также описываются конструирование и характеристика различных мутантных p55-TNF-рецепторов, имеющих мутации во внеклеточном, трансмембранном и внутриклеточном доменах p55-TNF-R. Таким образом, области, находящиеся в вышеуказанных доменах p55-TNF-R, были идентифицированы как главные области функционирования рецептора (т.е. связывания с лигандом TNF) с последующей трансдукцией сигнала и внутриклеточной передачей сигнала, приводящих, в конечном счете, к TNF-эффекту, наблюдаемому на клетках. Кроме того, в этом патенте описан ряд методов выделения и идентификации белков, пептидов и других факторов, которые способны связываться с различными областями в вышеуказанных доменах TNF-R, причем, указанные белки, пептиды и другие факторы могут участвовать в регуляции или модуляции активности TNF-R. В [EPO 568925] также раскрываются способы выделения и клонирования ДНК-последовательностей, кодирующих указанные белки и пептиды; способы конструирования экспрессирующих векторов для продуцирования этих белков и пептидов; и способы получения антител или их фрагментов, которые взаимодействуют с TNF-рецепторами или с вышеуказанными белками и пептидами, связывающимися с различными областями TNF-R. Однако, в [EPO 568925] отсутствуют какие-либо описания белков и пептидов настоящего изобретения, которые связываются с внутриклеточными доменами TNF-R (например, p55-TNF-R), а также отсутствуют какие-либо описания способа выделения и идентификации таких белков или пептидов с использованием дрожжевой двухгибридной системы. Кроме того, до сих пор также не были описаны белки или пептиды, способные связываться с внутриклеточным доменом FAS-R.

Таким образом, для ингибирования действия TNF или FAS-R-лиганда необходимо уменьшить количество или активность TNF-R или FAS-R на поверхности клетки, тогда, как для стимуляции действия TNF или FAS-R-лиганда необходимо увеличить количество или активность TNF-R или FAS-R. Для этой цели, недавно, авторами настоящего изобретения были секвенированы и проанализированы промоторы p55-TNF-R и p75-TNF-R, в результате чего было установлено, что ряд их ключевых "мотивов" имеют последовательности, характерные для различных факторов регуляции транскрипции; а поэтому, в сущности, экспрессия TNF-R, может регулироваться на уровне их промотора, т.е., может быть достигнуто ингибирование транскрипции, иницируемой промотором, в целях снижения числа рецепторов, либо усиление транскрипции, иницируемой промотором, в целях увеличения числа рецепторов [см., 1L 104355 и 1L 109633, и их соответствующие, еще не опубликованные Европейский патент и PCT-патент]. О соответствующих исследованиях, относящихся к регулированию FAS-R на уровне промотора FAS-R-гена, пока еще не сообщалось.

Кроме того, следует также отметить, что хотя, как известно, рецепторы фактора некроза опухолей (TNF) и их структурно родственный рецептор FAS-R (стимулятор в клетках), после стимуляции лейкоцит-продуцированными лигандами, проявляют деструктивную активность, что приводит к их собственному

разрушению, тем не менее, механизмы такой стимуляции остаются все еще малопонятными. Мутационные исследования показали, что FAS-R и P55-TNF-рецептор (p55-R), передающие сигналы цитотоксичности, имеют в своих внутриклеточных доменах особые области [Brackebush и др., 1992; Tartaglia и др., 1993; Iton и Nagata, 1993]. Эти области ("домены смерти") имеют сходные последовательности. Такие "домены смерти" обоих FAS-R и p55-R имеют тенденцию к самоассоциации. Самоассоциация этих доменов, очевидно, стимулирует агрегацию этих рецепторов, которая является необходимой для инициации передачи сигнала (как показано ниже, а также [как описано Song и др., 1994; Wallach и др., 1994; Boldin и др., 1995], и при высоких уровнях экспрессии рецептора может приводить к стимуляции лиганд-независимой передачи сигнала (как показано ниже, и [как описано Boldin и др., 1995]).

Таким образом, до появления настоящего изобретения не было каких-либо сообщений о получении белков, которые могут регулировать действие лигандов, принадлежащих к суперсемейству TNF/NGF (например, действие TNF или FAS-R-лиганда на клетки), опосредуя передачу внутриклеточного сигнала, управляемую, по всей вероятности, внутриклеточными доменами (1C) рецепторов, принадлежащих к суперсемейству рецепторов TNF/NGF, (таких, как TNF-рецепторы), а именно, внутриклеточными доменами p55- и p75-TNF-R (p551C и p751C, соответственно), а также EAS-1C.

В соответствии с этим, одной из целей настоящего изобретения является получение белков, обладающих способностью связываться с внутриклеточными доменами TNF-R и FAS-R, причем, эти белки, как предполагается в настоящее время, участвуют во внутриклеточной передаче сигнала, инициируемой посредством связывания TNF с его рецепторами, или связывания FAS-лиганда с его рецепторами.

Другой целью настоящего изобретения является получение антагонистов (например, антител) против указанных белков, связывающихся с внутриклеточным доменом (1C-связывающее антитело), которые, если это необходимо, могут быть использованы для ингибирования передачи сигнала, в том случае, если такие 1C-связывающие белки являются позитивными эффекторами сигнала (т.е., индуцируют передачу сигнала), либо они могут быть использованы для усиления передачи сигнала, в том случае, если такие 1C-связывающие белки являются негативными эффекторами сигнала (т.е., ингибируют передачу сигнала).

Еще одной целью настоящего изобретения является использование таких 1C-связывающих белков для выделения и характеристики других белков или факторов, которые могут, например, участвовать в последующих процессах передачи сигнала, и/или для выделения и идентификации других рецепторов, участвующих в предшествующем процессе передачи сигнала, с которыми связываются эти 1C-связывающие белки (например, другие TNF-R или родственные рецепторы), и следовательно, за функции которых эти белки также ответственны.

Кроме того, целью настоящего изобретения является использование вышеупомянутых 1C-связывающих белков в качестве антигенов для продуцирования поликлональных и/или моноклональных антител против этих белков. Полученные таким образом антитела могут быть, в свою очередь, использованы для очистки новых 1C-связывающихся белков из различных источников, таких, как клеточные экстракты или трансформированные клеточные линии.

Эти антитела могут быть также использованы в диагностических целях, например, для идентификации расстройств, связанных с нарушением клеточных функций, опосредуемых рецепторами, принадлежащими к суперсемейству рецепторов TNF/NGF.

Другой целью настоящего изобретения является получение фармацевтических композиций, содержащих вышеуказанные 1C-связывающие белки, и фармацевтических композиций, содержащих антагонисты 1C-связывающих белков, для лечения или профилактики TNF-индуцированных или FAS-лиганд-индуцированных состояний; причем, указанные композиции могут быть использованы для усиления действия TNF или FAS-лиганда, либо для ингибирования действия TNF или FAS-лиганда в зависимости от природы вышеуказанного 1C-связывающего белка или его антагониста, содержащегося в данной композиции.

Кроме того, в соответствии с еще одной целью настоящего изобретения, в настоящем описании раскрываются другие способы элиминации или ингибирования эндогенно образуемого или экзогенно введенного TNF или FAS-R-лиганда посредством использования растворимых олигомерных TNF-рецепторов, олигомерных FAS-рецепторов, или олигомеров, представляющих собой смесь TNF-рецепторов и FAS-рецепторов. В этой связи следует отметить, что была предпринята одна попытка выделить и продуцировать, с помощью техники рекомбинантных ДНК, TNF-связывающий белок, названный TBP-1, который, как было показано, обладал способностью ингибировать действие TNF. Антагонизм указанного белка был определен путем измерения снижения цитотоксической активности TNF, а также путем измерения уровня его ингибирования связывания TNF со своими рецепторами [EP 308378]. Как было обнаружено, TBP-1 обеспечивает защиту клеток от токсического действия TNF при концентрациях в несколько наногرامмов на один миллилитр, и противодействует связыванию TNF- α и TNF- β с клетками при одновременном введении этого белка с указанными цитокинами. Последующее исследование механизма, по которому действует TBP-1, выявило, что TBP-1 не взаимодействует с клеткой-мишенью, а скорее всего, блокирует функцию TNF путем специфического связывания с TNF, конкурируя, тем самым, с его рецептором.

Позднее, с использованием другого метода очистки, было обнаружено присутствие двух активных компонентов, одним из которых является TBP-1, а другим является второй TNF-связывающий белок, названный нами TBP-11 - (впервые описан в [EP 398327]). Оба эти белка обеспечивали защиту клеток от цитотоксического *in vitro* - действия TNF, и оба белка связывались с TNF- β менее эффективно, чем TNF- α . Хотя в анализе, проведенном с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН, было установлено, что белки TBP-1 и TBP-11 имеют очень близкие молекулярные массы, однако, их можно отличить друг от друга по отсутствию иммунологической перекрестной реактивности, по различию N-концевых аминокислотных последовательностей, и по различию аминокислотного состава.

Однако, вышеупомянутые TNF-связывающие белки являются мономерными и способны связываться лишь с одним мономером гомотримера TNF, натурального лиганда, в результате чего этот TNF все еще остается активным (т.е., неполностью нейтрализованным) благодаря тому, что у этого тримера имеется еще

два активных мономера, не связанных TNF-связывающими белками. Кроме того, до сих пор не были описаны растворимые FAS-R (растворимые белки, связывающиеся с FAS-R-лигандом), способные связываться с лигандом для FAS-R, который, как известно, представляет собой гомотримерную молекулу, ассоциированную с клеточной поверхностью.

Так называемый "домен смерти (клеток)" рецептора p55-TNF (обозначенного p55-1C) был описан в [работе Tartaglia и др. (1993)], однако, в этой работе не показано (как это сделано в настоящей заявке), что p55-1C и его "домен смерти" являются самоассоциирующимися, и эта самоассоциация ответственна, главным образом, за передачу сигнала, приводящего к индуцированию цитотоксического воздействия на клетку. Кроме того, в этой публикации ничего не сообщается в возможности продуцирования растворимых олигомерных TNF-рецепторов или растворимых олигомерных Fas -рецепторов, а также умалчивается о других TNF-ассоциированных эффектах, индуцируемых p55-1C или его фрагментами, например, о таких эффектах, как индуцирование экспрессии гена 1L-8, которые рассматриваются в настоящем изобретении. В другой работе, опубликованной после подачи настоящей заявки, раскрывается способность к агрегации (т.е., к самоассоциации) p55-1C, но также ничего не упоминается ни о получении растворимых олигомерных TNF-рецепторов и FAS-рецепторов, ни о других TNF-ассоциированных эффектах, индуцируемых лиганд-независимым способом p55-1C или его фрагментами, раскрываемыми в настоящей заявке.

При работе над настоящим изобретением, мы обнаружили новые белки, способные связываться с внутриклеточным доменом p55-TNF-рецептора (p551C-связывающие белки), p75-TNF-рецептора (p751C-связывающие белки), и FAS-рецептора (FAS-1C-связывающие белки). Эти p551C, p751C и FAS-1C-связывающие белки могут действовать как медиаторы или модуляторы эффекторного действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки путем опосредования или модуляции внутриклеточной передачи сигнала, которая происходит после связывания TNF с p55- и/или p75-TNP-R или связывания FAS-R-лиганда на клеточной поверхности. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что p551C и FAS-1C обладают способностью к самоассоциации, и что фрагменты p551C, и FAS-1C одинаково способны связываться с p55-1C, особенно, с так называемыми "доменами смерти (клеток)" (DD), находящимися во внутриклеточных доменах (1C) этих рецепторов, т.е., p55DD и FAS-DD. Таким образом, p55-1C и FAS-1C и их фрагменты также представляют собой белки, способные связываться с p551C и FAS-1C, а поэтому, они могут быть модуляторами действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением была более полно раскрыта природа связывания одного из новых белков (обозначенного в настоящем описании белком 55.11) с внутриклеточным доменом p55-TNF-рецептора (см. Пример 1).

Более того, в другом своем аспекте, настоящее изобретение основано на обнаружении того факта, что внутриклеточный домен рецептора p55-TNF (p55-1C); область, содержащаяся в нем (так называемый "домен смерти" p55-1C); а также внутриклеточный домен рецептора Fas/APO1 (Fas-1C); и область, содержащаяся в нем (так называемый "домен смерти" Fas-1C), обладают способностью к самоассоциации. В соответствии с этим, можно, с помощью стандартной техники рекомбинантных ДНК, сконструировать растворимый олигомерный TNF-рецептор, который является гибридным продуктом, содержащим, у одного своего конца, по крайней мере, два внеклеточных домена TNF-рецептора, и у другого своего конца, по крайней мере, два вышеуказанных самоассоциирующихся внутриклеточных доменов или их фрагментов, где в результате такой самоассоциации образуется олигомер, имеющий, по крайней мере, два гибридных продукта, соединенных вместе. Таким образом, указанный растворимый олигомерный TNF-рецептор способен связываться с двумя мономерами натурального гомотримера TNF, и как таковой эффективно нейтрализует активность TNF. Нейтрализация активности TNF является желательной во всех вышеупомянутых условиях, где наблюдается продуцированное эндогенно или введенное экзогенно чрезмерное количество TNF, приводящее к нежелательным побочным эффектам. Кроме того, эффективное связывание TNF с растворимыми олигомерными рецепторами настоящего изобретения может служить для связывания экзогенно добавленного TNF и его последующего желательного пролонгированного высвобождения в условиях, при которых введение TNF оказывает благоприятное действие, например, при опухолевой терапии. Аналогичным образом, с использованием стандартной техники рекомбинантных ДНК, может быть сконструирован олигомерный FAS-рецептор, являющийся гибридным продуктом, содержащим, по крайней мере, два внеклеточных домена FAS-рецептора на одном своем конце, и по крайней мере, два вышеуказанных самоассоциирующихся внутриклеточных домена или его фрагментов, где в результате такой самоассоциации образуется олигомер, имеющий, по крайней мере, два гибридных продукта, соединенных вместе. Таким образом, указанный олигомерный FAS-R способен связываться с двумя мономерами натурального гомотримера FAS-R-лиганда, и эффективно нейтрализовать активность FAS-R-лиганда. Нейтрализация активности FAS-R-лиганда является желательной во всех вышеупомянутых ситуациях, где избыточное количество этого лиганда ассоциируется с нежелательными побочными эффектами. Аналогичным образом, если принять во внимание недавние сообщения, указывающие на возможную связь между TNF и FAS-R-лиганд-индуцированными воздействиями на клетки, а следовательно, на возможную их географическую ассоциацию на клеточной поверхности, где они связываются со своими рецепторами, то становится очевидным, что с помощью стандартной техники рекомбинантных ДНК можно сконструировать смешанный олигомерный рецептор, обладающий специфичностью как к TNF, так и к FAS-R-лиганду. Такой смешанный олигомер должен представлять собой смесь вышеуказанных гибридных продуктов, содержащих, по крайней мере, один внеклеточный домен TNF-рецептора и, по крайней мере, один внеклеточный домен FAS-рецептора у своего одного конца, и, по крайней мере, два вышеупомянутых самоассоциирующихся внутриклеточных домена или их фрагментов у своего другого конца, где в результате такой самоассоциации образуется смешанный олигомер, имеющий, по крайней мере, два таких гибридных продукта, соединенные вместе. Таким образом, указанный смешанный олигомер способен связываться в одно и то же время, по крайней мере, с одним мономером TNF и с одним мономером FAS-R-лиганда, способствуя, тем самым, снижению или эффективной нейтрализации активности TNF и FAS-R-лиганда на клеточной поверхности в

условиях, при которых, как указано выше, избыточные количества этих двух цитокинов ассоциируются с нежелательными побочными клеточными эффектами. Как указывалось выше, FAS-R-лиганд, в основном, ассоциирован с клеточной поверхностью, а в недавних публикациях также описаны формы TNF, ассоциированные с клеточной поверхностью. Поэтому, указанные смешанные олигомеры TNF-R/FAS-R являются особенно эффективными для нейтрализации активности TNF и FAS-R-лиганда на клеточной поверхности.

В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к ДНК-последовательности, кодирующей белок, способный связываться с одним или несколькими внутриклеточными доменами одного или нескольких рецепторов, принадлежащих к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухолей/фактора роста нервной ткани (TNF/NGF).

В частности, настоящее изобретение относится к ДНК-последовательности, выбранной из группы, включающей в себя:

а) кДНК-последовательность, происходящую от области, кодирующей нативный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом TNF-R i

б) ДНК-последовательности, способные к гибридизации с ДНК а) в условиях умеренной жесткости, и кодирующие биологически активный белок, который связывается с внутриклеточным доменом TNF-R;

с) ДНК-последовательности, которые являются вырожденными по отношению к ДНК-последовательностям, определенным в а) и б), в результате вырожденности генетического кода, и которые кодируют биологически активный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом TNF-R.

Настоящее изобретение также относится к ДНК-последовательности, выбранной из группы, включающей в себя:

а) кДНК-последовательность, происходящую от области, кодирующей нативный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом FAS-R.

б) ДНК-последовательности, которые способны к гибридизации с кДНК (а) в умеренно строгих условиях, и которые кодируют биологически активный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом FAS-рецептора;

с) ДНК-последовательности, которые являются вырожденными по отношению к ДНК-последовательностям, определенным в а) и б), в результате вырожденности генетического кода, и которые кодируют биологически активный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом FAS-R.

В конкретных вариантах своего осуществления, настоящее изобретение относится к ДНК-последовательностям, кодирующим белки, которые связываются с внутриклеточным доменом p55-TNF-рецептора, p75-TNF-рецептора и FAS-рецептора, например, к ДНК-последовательностям, кодирующим белки, обозначенные 55.1; 55.3; 55.11; 75.3; 75.16; F2; F9 и DD11.

Настоящее изобретение также относится к белкам, их аналогам или производным, закодированным любой из вышеуказанных последовательностей настоящего изобретения, и способным связываться с одним или несколькими внутриклеточными доменами одного или нескольких TNF-рецепторов или FAS-рецептора. Варианты этого аспекта настоящего изобретения включают в себя белки, обозначенные 55.1, 55.3, 55.11, 75.3, 75.16, F2, F9 и DD11, их аналоги и их производные.

Настоящее изобретение также относится к векторам, кодирующим вышеуказанные белки настоящего изобретения, и содержащим вышеуказанные ДНК-последовательности настоящего изобретения; причем, указанные векторы способны экспрессироваться в соответствующих эукариотических или прокариотических клетках-хозяевах. Кроме того, настоящее изобретение относится к трансформированным эукариотическим или прокариотическим клеткам-хозяевам, содержащим указанные векторы; и к способу продуцирования белков, их аналогов или производных настоящего изобретения путем культивирования таких трансформированных клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии указанных белков, с последующей пост-трансляционной модификацией указанных белков, если это необходимо, и экстракцией экспрессированного белка, его аналога или производного из культуральной среды указанных трансформированных клеток или из клеточных экстрактов указанных трансформированных клеток.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к антителам или к их активным производным или фрагментам, специфичным к белкам, аналогам и производным белков настоящего изобретения.

В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к использованию ДНК-последовательностей настоящего изобретения или белков настоящего изобретения, кодируемых этими последовательностями; причем, это использование предусматривает осуществление, в частности, следующих способов:

i) способа модуляции действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки, несущие TNF-рецептор или FAS-рецептор, заключающегося в обработке указанных клеток одним или несколькими белками, выбранными из группы, включающей в себя белки, аналоги и производные настоящего изобретения, и белки p551C, p55DD FAS-1C или FAS-DD, их аналоги или производные, где все указанные белки способны связываться с внутриклеточным доменом и модулировать активность TNF-R или FAS-R, а указанная обработка клеток предусматривает введение в эти клетки одного или нескольких белков, их аналогов или производных в форме, подходящей для внутриклеточного введения; либо указанная обработка предусматривает введение в эти клетки ДНК-последовательности, в форме подходящего экспрессирующего вектора, кодирующей указанный один или указанные несколько белков, их аналогов или производных;

ii) способ модуляции действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки, несущие TNF-R или FAS-R, заключающегося в обработке этих клеток антителами, их активными производными или фрагментами настоящего изобретения;

iii) способа модуляции действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки, несущие TNF-R или FAS-R, заключающегося в обработке этих клеток олигонуклеотидной последовательностью, кодирующей последовательность, являющуюся антисмысловой, по крайней мере, к части последовательности настоящего изобретения; либо олигонуклеотидной последовательностью, кодирующей последовательность, являющуюся

антисмысловой по отношению к последовательности p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD; причем, указанная олигонуклеотидная последовательность способна блокировать экспрессию, по крайней мере, одного из белков, связывающихся с внутриклеточным доменом TNF-R или FAS-R;

iv) способа модуляции действия TNF или TNF-R-лиганда на клетки, несущие TNF-R, или FAS-R, предусматривающего:

a) конструирование рекомбинантного вектора, происходящего от вируса животных, и несущего последовательность, кодирующую белок вирусной поверхности, который способен связываться со специфическим рецептором клеточной поверхности, и последовательность, выбранную из олигонуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность, являющуюся анти-смысловой, по крайней мере, к части последовательности настоящего изобретения, и олигонуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность, являющуюся антисмысловой по отношению к последовательности p551C, p55DD FAS-1C или FAS-DD причем, при введении в указанные клетки указанного вируса, указанная олигонуклеотидная последовательность способна блокировать экспрессию, по крайней мере, одного из белков, связывающихся с внутриклеточным доменом TNF-R или FAS-R; и

b) инфицирование указанных клеток вектором, определенным в а);

v) способ модуляции действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки, несущие TNF-R или FAS-R, заключающегося в обработке этих клеток соответствующим вектором, кодирующим рибозиму, имеющую последовательность, специфичную к последовательности, выбранной из МПНК-последовательности, кодирующей белок, аналог или производное настоящего изобретения, и МПНК-последовательности, кодирующей p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD; причем, указанная последовательность рибозимы способна взаимодействовать с МПНК-последовательностью, а также способна расщеплять указанную МПНК-последовательность, что приводит к ингибированию экспрессии белка, аналога или производного настоящего изобретения или к ингибированию экспрессии p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD;

vi) способа обработки опухолевых клеток или ВИЧ-инфицированных клеток или клеток, подверженных другим заболеваниям, предусматривающего:

a) конструирование рекомбинантного вектора, происходящего от вируса животных, и несущего последовательность, кодирующую белок вирусной поверхности, который обладает способностью связываться с рецептором поверхности опухолевой клетки или рецептором поверхности ВИЧ-инфицированной клетки, или который обладает способностью связываться с другим рецептором поверхности клетки, подверженной другим нарушениям; и последовательность, выбранную из последовательности настоящего изобретения, кодирующей белок, аналог или производное настоящего изобретения, и последовательности, кодирующей p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD, или их биологически активный аналог или производное; причем, указанный белок, аналог или производное настоящего изобретения, или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD или их аналог или производное, при введении в указанные опухолевые или ВИЧ-инфицированные клетки или клетки с другими нарушениями, обладают способностью к уничтожению этих клеток;

b) инфицирование указанных опухолевых клеток или ВИЧ-инфицированных клеток или клеток с другими нарушениями вектором, определенным в а);

vii) способа выделения и идентификации белков, факторов или рецепторов, способных связываться с белками настоящего изобретения, связывающимися с внутриклеточным доменом, где указанный способ предусматривает осуществление аффинной хроматографии, в которой указанный белок настоящего изобретения связывают с матриксом для аффинной хроматографии, и этот связанный белок подвергают контакту с клеточным экстрактом, после чего белки, факторы или рецепторы из этого клеточного экстракта, которые связываются с указанным связанным белком, элюируют, выделяют и анализируют;

viii) способа выделения и идентификации белков, способных связываться с белками настоящего изобретения, связывающихся с внутриклеточным доменом, где указанный способ предусматривает получение дрожжевой двухгибридной системы, в которой последовательность, кодирующую указанный белок, связывающийся с внутриклеточным доменом, несет один гибридный вектор, а последовательность, происходящую из библиотеки кДНК или геномной ДНК, несет второй гибридный вектор, после чего, векторы, используемые для трансформации дрожжевых клеток-хозяев выделяют с последующей экстракцией второго гибридного вектора для получения последовательности, кодирующей белок, который связывается с указанным белком, связывающимся с внутриклеточным доменом; и

ix) способа выделения и идентификации белка, способного связываться с внутриклеточными доменами TNF-рецепторов или FAS-рецепторов, предусматривающего осуществление Саузерн-гибридизации в нестрогих условиях с последующим PCR-клонированием, в котором последовательность настоящего изобретения или ее часть используют в качестве зонда для гибридизации с последовательностями из библиотеки кДНК или библиотеки геномной ДНК, имеющего, по крайней мере, частичную гомологию с указанными последовательностями, а затем, указанные гибридизованные последовательности подвергают амплификации и клонированию с помощью полимеразной цепной реакции (PCR), в результате чего получают клоны, кодирующие белки, обладающие, по крайней мере, частичной гомологией к указанным последовательностям настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для модуляции действия TNF или FAS-лиганда на клетки, содержащей в качестве активного ингредиента любой один компонент из следующих компонентов: i) белок настоящего изобретения, или такой белок, как p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, его биологически активные фрагменты, аналоги, производные или их смеси; (LL) рекомбинантный вектор, происходящий от вируса животного, и кодирующий вирусный поверхностный белок, способный связываться с рецепторами TNF-Ц, или FAS-R-DD несущих клеток или опухолевых клеток, и последовательность, кодирующую белок, аналог или производное настоящего изобретения, или последовательность, кодирующую p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD; (iii) рекомбинантный вектор, происходящий от вируса животного, и кодирующий вирусный поверхностный белок, определенный выше в (ii)

и олигонуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, являющуюся антисмысловой по отношению к последовательности p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD; и iv) вектор, кодирующий рибозиму с последовательностью, способной взаимодействовать с мРНК-последовательностью, кодирующей белок, аналог или производное настоящего изобретения, или с мРНК-последовательностью, кодирующей p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD.

В конкретном варианте вышеуказанных аспектов, настоящее изобретение относится к использованию p55-1C или ДНК, кодирующей p55-1C. Этот вариант изобретения основан на обнаружении того факта, что p55-1C может лиганд (TNF)-независимым образом индуцировать в клетках другие TNF-ассоциированные эффекты. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к способу индуцирования TNF-ассоциированных эффектов в клетках или тканях, предусматривающему обработку указанных клеток одним или несколькими белками, их аналогами или производными, где указанные один или несколько белков выбирают из белков, все из которых являются самоассоциирующимися внутриклеточными доменами p55-TNF-R (p55-1C) или их частями, способными к самоассоциации и индуцированию TNF-эффекта в клетках лиганд (TNF)-независимым образом; причем, указанная обработка клеток предусматривает введение в эти клетки указанных одного или нескольких белков, их аналогов или производных в форме, подходящей для внутриклеточного введения, либо введение к эти клетки ДНК-последовательности, кодирующей указанные один или несколько белков, их аналогов или производных, в виде подходящего вектора, несущего эту последовательность, и способного вводить эту последовательность в указанные клетки так, чтобы эта последовательность могла экспрессироваться в этих клетках.

Вариантами вышеуказанного способа настоящего изобретения являются:

i) способ, где указанную обработку клеток осуществляют путем трансфекции указанных клеток рекомбинантным вектором на основе вируса животного; причем, указанный способ включает в себя следующие стадии:

a) конструирование рекомбинантного вирусного вектора, несущего последовательность, кодирующую вирусный поверхностный белок (лиганд), способный связываться со специфическим рецептором на поверхности указанных обрабатываемых клеток; и вторую последовательность, кодирующую белок p55-1C или его фрагменты, аналоги и производные, где указанный белок, при его экспрессии в указанных клетках, способен к самоассоциации и индуцированию одного или нескольких TNF-ассоциированных эффектов; и

b) инфицирование указанных клеток вектором (a);

ii) способ, где указанным TNF-эффектом, индуцируемым в указанных клетках, является индуцирование экспрессии гена 1L-8, а указанным вектором является вектор, несущий последовательность, кодирующую, в основном, весь указанный p55-1C, его фрагменты, аналоги и производные, которые, при их экспрессии в клетках, способны к самоассоциации и передаче сигнала для индуцирования экспрессии указанного гена 1L-8;

iii) способ обработки опухолевых или вирус-инфицированных клеток, или способ усиления антибактериального действия гранулоцитов, где указанный вирусный вектор несет последовательность, кодирующую вирусный лиганд, способный связываться со специфическим рецептором на поверхности указанных опухолевых клеток, вирус-инфицированных клеток или гранулоцитов, и последовательность, кодирующую указанный p55-1C, его фрагменты, аналоги и производные, которые при экспрессии в указанных опухолевых клетках, вирус-инфицированных клетках или гранулоцитах, индуцируют TNF-ассоциированные эффекты, приводящие к гибели этих клеток;

iv) способ обработки опухолевых клеток, где указанный p55-1C, его фрагменты, аналоги или производные, при экспрессии в опухолевых клетках, индуцируют экспрессию 1L-8, которая вызывает цитоллиз указанных опухолевых клеток благодаря их хемотаксической активности, притягивающей гранулоциты и другие лимфоциты к опухолевым клеткам, и приводящей, тем самым, к гибели опухолевых клеток.

В этом своем аспекте, настоящее изобретение также относится к внутриклеточному домену p55-R, (p55-1C) его фрагментам, аналогам и производным, используемым для обработки клеток путем индуцирования в этих клетках TNF-ассоциированных эффектов; и к следующим его вариантам:

v) p55-1C, его части, аналоги, и производные для использования в обработке клеток путем индуцирования в них экспрессии гена 1L-8.

vi) p55-1C, его части, аналоги и производные для использования в обработке опухолевых клеток путем индуцирования в них экспрессии гена 1L-8, приводящей к гибели этих опухолевых клеток.

Кроме того, в этом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для обработки клеток путем индуцирования в них TNF-ассоциированных эффектов, где указанная композиция содержит p55-1C, его фрагменты, аналоги, и все их производные в качестве активного ингредиента, и фармацевтически приемлемый носитель; а также к следующим вариантам этой фармацевтической композиции:

i) фармацевтическая композиция для обработки клеток путем индуцирования в них TNF-ассоциированных эффектов, содержащая в качестве активного ингредиента рекомбинантный вектор, происходящий от вируса животного, и кодирующий p55-1C, его фрагменты, аналоги, и все их производные, и белок, способный связываться с поверхностным белком на обрабатываемых клетках;

ii) фармацевтическая композиция для обработки опухолевых клеток, введение которой приводит к индуцированию экспрессии 1L-8, и последующей гибели опухолевых клеток.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к растворимому олигомерному рецептору фактора некроза опухолей (TNF-R), состоящему, по крайней мере, из двух самоассоциированных гибридных белков, каждый из которых имеет a) на одном своем конце, TNF-связывающий домен, выбранный из внеклеточного домена TNF-R, его аналогов или производных; причем указанный внеклеточный домен, его аналоги или производные неспособны к нежелательной самоассоциации, и способны связываться с TNF; и c) на другом своем конце, самоассоциирующийся домен, выбранный из (i) в основном полного внутриклеточного домена p55-TNF (p55-1C), простирающегося примерно от аминокислотного остатка 206 до примерно

аминокислотного остатка 426 нативной молекулы p55-TNF-рецептора (p55-R); ii) "домена смерти" p55-1C, простирающегося примерно от аминокислотного остатка 328 до примерно аминокислотного остатка 426 нативного p55-R; (iii) в основном, полного внутриклеточного домена рецептора FAS/APO1 (FAS-1C); iv) "домена смерти" FAS-1C; и v) аналогов, фрагментов, или производных любого из (i)-(iv), обладающих способностью к самоассоциации, где указанные, по крайней мере, два самоассоциирующиеся белка подвергаются самоассоциации только в указанных концах (b), а у своих концов (a), эти белки способны связываться, по крайней мере, с двумя мономерами TNF, причем, каждый из концов (a) способен связываться с одним мономером TNF; и кроме того, настоящее изобретение относится к солям и функциональным производным указанного растворимого олигомерного TNF-R.

Варианты этого аспекта настоящего изобретения включают в себя все комбинации вышеуказанных концов (a) с концами (b), так, например, к этим вариантам относится растворимый олигомерный TNF-R, содержащий в качестве внеклеточного домена внеклеточный домен p55-R, а в качестве самоассоциирующегося внутриклеточного домена домен p55-1C.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения растворимого олигомерного TNF-R, предусматривающему:

a) конструирование экспрессирующего вектора, кодирующего любой один из указанных гибридных белков, где ДНК-последовательность каждого из указанных концов гибридного белка получают из клонированных ДНК-последовательностей, кодирующих в основном, полный внеклеточный домен TNF-R, его аналоги или производные; и из клонированных ДНК-последовательностей, кодирующих, в основном, полный p55-1C, "домен смерти" p55-1C, Fas-1C, "домен смерти" Fas-1C, и все их аналоги и производные; и полученные концы лигируют друг с другом, образуя последовательность гибридного белка, которую затем вставляют в указанный вектор под контроль последовательностей, регулирующих транскрипцию и трансляцию;

b) введение вектора (a) в соответствующую хозяйскую клетку, в которой экспрессируется указанный гибридный белок; и

c) очистку гибридного белка, экспрессированного в указанных клетках-хозяевах; причем, указанный гибридный белок подвергается самоассоциации до, в течение, или после процесса очистки, в результате которой получают растворимый олигомерный TNF-R.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору, кодирующему вышеуказанные гибридные белки, используемые в вышеописанном способе настоящего изобретения; к клеткам-хозяевам, содержащим этот вектор; а также к фармацевтической композиции, включающей в себя растворимый олигомерный TNF-R, его соли или функциональные производные и любые их смеси в качестве активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Аналогично, в соответствии с настоящим изобретением, растворимый олигомерный TNF-R, его соли, функциональные производные и любые их смеси могут быть использованы для ингибирования нежелательного действия TNF в клетках млекопитающих, а в частности, для лечения состояний, обусловленных избыточным присутствием эндогенно образованного или экзогенно введенного TNF; либо, альтернативно, они могут быть использованы для длительного поддержания благоприятного действия TNF в клетках млекопитающих при экзогенном введении TNF.

В соответствии с вышеописанным аспектом настоящего изобретения, следует также указать, что можно сконструировать растворимый олигомерный рецептор FAS/APO1 (FAS-R), который может быть использован для ингибирования нежелательного действия FAS-лиганда. Поэтому, в еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к растворимому олигомерному рецептору FAS/APO1 (FAS-R), состоящему, по крайней мере, из двух самоассоциированных гибридных белков, каждый из которых имеет (a) у одного своего конца, домен, связывающийся с FAS-лигандом, выбранный из внеклеточного домена FAS-R, его аналогов при производных, неспособных к самоассоциации и способных связываться с FAS-лигандом; и b) у другого своего конца, самоассоциирующийся домен, выбранный из (i) в основном, полного внутриклеточного домена P55-TNF-R, (p55-1C), простирающегося примерно от аминокислотного остатка 206 до примерно аминокислотного остатка 426 нативной молекулы p55-TNF-R (p55-R); (ii) "домена смерти" p55-1C, простирающегося примерно от аминокислотного остатка 328 до примерно аминокислотного остатка 426 нативного p55-R;

(iii) в основном, полного внутриклеточного домена рецептора FAS/APO1 (FAS-1C); (iv) "домена смерти" FAS-1C; и (v) аналогов и производных любого из (i)-(iv), обладающих способностью к самоассоциации, где указанные, по крайней мере, два самоассоциирующиеся белка подвергаются самоассоциации только в указанных концах (b), и имеют указанные концы (a), способные связываться, по крайней мере, с двумя мономерами FAS-лиганда, причем, каждый из концов (a) способен связываться с одним мономером FAS-лиганда; и кроме того, настоящее изобретение относится к солям и функциональным производным указанного растворимого олигомерного FAS-рецептора.

В соответствии с этим аспектом, настоящее изобретение также относится к способу получения растворимого олигомерного FAS-R, предусматривающему:

a) конструирование экспрессирующего вектора, кодирующего один из любых указанных гибридных белков, где ДНК-последовательность каждого из указанных концов гибридного белка получают из клонированных ДНК-последовательностей, кодирующих, в основном, полный внеклеточный домен FAS-R, его аналоги или производные; и из клонированных ДНК-последовательностей, кодирующих, в основном, весь p55-1C, "домен смерти" p55-1C, FAS-1C, "домен смерти" FAS-1C, все их аналоги и производные; и полученные концы лигируют вместе, образуя последовательность гибридного белка, которую затем вставляют в указанный вектор под контроль транскрипционных и трансляционных регуляторных последовательностей;

b) введение вектора (a) в соответствующую хозяйскую клетку, в которой экспрессируется указанный гибридный белок;

c) очистку гибридного белка, экспрессированного в указанных клетках-хозяевах, причем, указанный гибридный белок подвергается самоассоциации до, во время, или после процесса очистки, в результате

которой получают растворимый олигомерный FAS-R.

Кроме того, настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему последовательность, кодирующую растворимый олигомерный FAS-R, используемый в вышеописанном способе; к клеткам-хозяевам, содержащим указанный вектор; и к фармацевтическим композициям, включающим в себя растворимый олигомерный FAS-R, его соли или функциональные производные, или любые их смеси в качестве активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями. Аналогично, настоящее изобретение относится к растворимому олигомерному FAS-R, его солям, или функциональным производным или любым их смесям, которые могут быть использованы для ингибирования нежелательного действия FAS-лиганда в клетках млекопитающих, а в частности, для лечения состояний, обусловленных избыточным присутствием эндогенно образованного или экзогенно введенного FAS-лиганда.

Аналогично вышеприведенному описанию, касающемуся олигомерных рецепторов TNF и олигомерных рецепторов FAS, можно также сконструировать смешанные олигомеры, способные специфически связываться как с TNF, так и с FAS-R-лигандом. Таким образом, настоящее изобретение также относится к смешанным олигомерным TNF-R/FAS-R, состоящим, по крайней мере, из двух самоассоциированных гибридных белков, один из которых выбирают из любых вышеуказанных TNF-специфических гибридных белков, а другой выбирают из любых вышеуказанных FAS-R-лиганд-специфических гибридных белков, в результате чего получают смешанный олигомер, имеющий, по крайней мере, один внеклеточный домен TNF-R, и, по крайней мере, один внеклеточный домен FAS-R, соединенные вместе благодаря самоассоциации между внутриклеточными доменами или их фрагментами, гибридизированными с каждым из этих внеклеточных доменов. Эти смешанные олигомерные рецепторы конструируют путем получения, как описано выше, олигомерных TNF-рецепторов и олигомерных FAS-рецепторов, их последующего смешивания, а затем отбора, стандартными способами, тех олигомеров, которые способны к специфическому связыванию с FAS-R-лигандом и TNF. Другой способ получения смешанных олигомерных рецепторов заключается в трансфекции подходящих клеток-хозяев векторами (описанными выше), кодирующими любой из TNF-специфических гибридных белков (растворимых TNF-рецепторов), и кодирующими любой из FAS-R-лиганд-специфических гибридных белков (растворимых FAS-рецепторов); очистки экспрессированных гибридных белков, которые подвергаются самоассоциации до, во время, и после очистки, в результате которой получают олигомерные рецепторы; и последующего отбора с помощью стандартной техники тех олигомерных рецепторов, которые обладают способностью связываться с TNF и FAS-R-лигандами.

Аналогичным образом, могут быть получены фармацевтические композиции, содержащие смешанные олигомерные рецепторы, их соли или функциональные производные, или любые их смеси в качестве активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, настоящее изобретение относится к смешанным олигомерным рецепторам, их солям или функциональным производным или любым их смесям, которые могут быть использованы для ингибирования нежелательного действия TNF и FAS-R-лиганда в организме млекопитающих, а в частности, для лечения состояний, обусловленных избыточным присутствием эндогенно образованных или экзогенно введенных TNF и FAS-R-лиганда; либо альтернативно, они могут быть использованы для длительного (продолжительного) поддержания благоприятного действия TNF и/или FAS-R-лиганда в тканях млекопитающих при экзогенном введении TNF и/или FAS-R-лиганда (в растворимой форме).

Другие аспекты и варианты настоящего изобретения будут также очевидны из нижеприведенного подробного описания изобретения.

При этом следует отметить, что используемые в настоящем описании термины "модуляция действия TNF на клетки" и "модуляция действия FAS-лиганда на клетки" подразумевают обработку как *in vitro* так и *in vivo*.

На рис.1a-d схематически изображена неполная и предварительная нуклеотидная последовательность кДНК-клонов, кодирующих р551С- и р751С-связывающие белки, и выведенная аминокислотная последовательность белка 55.11, где на рис.1(a) изображена последовательность (SEQ ID NO:9) клона 55.11, кодирующая р551С-связывающий белок 55.11; на рис. 1(b) изображена частичная и предварительная последовательность (SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11) клона 75.3, кодирующая р751С-связывающий белок 75.3; и на рис.1(c) изображена частичная и предварительная последовательность (SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:13) клона 75.16, кодирующая р751С-связывающий белок р75.16 (все указанные последовательности описаны в Примере 1); а на рис.1(d) изображена выведенная аминокислотная последовательность белка 55.11 (SEQ ID NO:14), полученная исходя из нуклеотидной последовательности, изображенной на рис.1(a), и описанная в Примере 1.

На рис.2 проиллюстрирован Нозерн-блот-анализ, который выявил присутствие 55.11-специфический мРНК в ряде тестированных клеточных линиях, как описано в Примере 1.

На рис.3A и 3B представлены автордиограммы, иллюстрирующие *in vitro* -связывание белка, кодируемого 55.11-кДНК, с GST-гибридными белками, содержащими части р55-1С; где на рис.3A проиллюстрировано связывание полноразмерного белка 55.11 (55.11-full) с различными GST-гибридными белками; а на рис.3B проиллюстрировано связывание части 55.11, сцепленной с октапептидом FLAG, с различными GST-гибридными белками (все они описаны в Примере 1).

На рис.4 схематически иллюстрируется сравнение выведенной аминокислотной последовательности 55.11 человека (SEQ ID NO:14) с последовательностями родственных белков, происходящих от низших организмов: YHRO27с (дрожжи; SEQ ID NO:15), SEN3 (дрожжи; SEQ ID NO:16), A. thaliana (растение; SEQ ID NO:17) и C. elegans (нематода; SEQ ID NO:18), как представлено в Примере 1.

На рис.5 показан Вестерн-блот, окрашенный поликлональной антисывороткой против MBP, и иллюстрирующий самоассоциацию р551С, где Вестерн-блот получали из ДСН-ПААГ-геля, на котором проводили электрофорез взаимодействующих бактериально продуцированных химерных белков р551С-MBP и р551С-GST (дорожки 1-4) или контроля (взаимодействие между химерным белком р551С-MBP и одним GST (дорожки 5-8); при этом взаимодействие между химерными белками (и контроля) проводили на глутатион-агарозных шариках до осуществления электрофореза на ПААГ с ДСН, как описано в Примере 2.

На рис.6 представлены фазово-контрастные микрофотографии, иллюстрирующие цитотоксическое действие полноразмерного p551C в клетках HT1080, трансфицированных экспрессирующим вектором, кодирующим этот p551C (правая панель); и ингибирование этого цитотоксического действия в случае, если экспрессия вектора блокируется путем обработки клеток тетрациклином (левая панель) как описано в Примере 2.

На рис.7 проиллюстрирована лиганд-независимая стимуляция цитотоксического эффекта в клетках HeLa, трансфицированных полноразмерным p55-R, его внутриклеточным доменом, или частями внутриклеточного домена, включая "домен смерти", где:

i) в самой крайней части рис.7 схематически показаны различные ДНК-молекулы, кодирующие полноразмерный p55-Bv, его внутриклеточный домен и фрагменты внутриклеточного домена, которые были встроены в вектор, с помощью которого трансфицировали клетки HeLa.

ii) левый и средний столбцы графика иллюстрируют экспрессию рецептора TMF в клетках HeLa для каждого из типов рецептора, показанных в самой левой части рис.7, при этом, левый столбец представляет количества рецептора в нг/кл. образца, а средний столбец графика представляет количества рецептора, выраженные в единицах радиоiodированного TNF, связанного с трансфицированными клетками; и

iii) правый столбец иллюстрирует вариативность клеток HeLa, экспрессирующих различные типы рецепторов; и где: во всех графиках, незаштрихованные прямоугольники представляют клетки, трансфицированные в присутствии тетрациклина, а заштрихованные прямоугольники представляют клетки, трансфицированные в отсутствие тетрациклина (все указанные варианты описаны в Примере 2).

На рис.8 проиллюстрировано лиганд-независимое индуцирование экспрессии гена 1L-8 в клетках HeLa, трансфицированных полноразмерным p55-R или его внутриклеточным доменом (p551C), где на панели А проиллюстрирован Нозерн-блот-анализ РНК, экстрагированной из клеток HeLa, обработанных или необработанных TNF (две левые дорожки, обозначенные "контроль" и "TNF"), и РНК, экстрагированной из клеток HeLa, трансфицированных векторами, кодирующими p55-R, p55-1C или контрольный белок, люциферазу (остальные дорожки, обозначенные "p55-1C", "p55-R", и "Luc", соответственно); при этом, в каждом случае, клетки были трансфицированы в присутствии (+) или в отсутствие (-) тетрациклина (поэтому для трансфицированных клеток имеются две дорожки); и где на панели В проиллюстрировано окрашивание 18S рРНК метиленовым голубым в каждом из образцов клеток HeLa, показанных на панели А (все вышеуказанные варианты описаны в Примере 2).

На рис.9 (А и В) графически проиллюстрировано лиганд-независимое стимулирование цитотоксического эффекта в клетках HeLa, трансфицированных p55R или его фрагментами, или FAS-1C, где на рис.9А представлены результаты для p55R, или их фрагментов, а на рис. 9В представлены результаты для FAS-1C. Слева, на панелях А и В, схематически изображены части p55R или FAS-1C, используемые для трансфекции, а справа на этих панелях графически представлены экспериментальные результаты (все указанные варианты описаны в Примере 2).

На рис.10 схематически изображена частичная и предварительная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20) кДНК-клона (обозначенного "F2"), который кодирует белок, способный связываться с p551C и FAS-1C, как описано в Примере 3.

На рис.11 схематически изображена частичная и предварительная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:21-23) кДНК-клона (обозначенного F9), которая кодирует белок, способный связываться с p551C и FAS-1C, как описано в Примере 3.

На рис.12 схематически изображена частичная и предварительная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO:24) кДНК-клона (обозначенного DD11), которая кодирует белок, способный связываться с p551C, а в частности p55DD и FAS-1C, как описано в Примере 3.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к новым белкам, которые обладают способностью связываться с внутриклеточным доменом рецепторов, принадлежащих к суперсемейству TNF/NGF, таким, как рецепторы TNF (TNF-R) и рецептор FAS (FAS-R), и которые, поэтому, являются медиаторами или модуляторами этого суперсемейства рецепторов, например, TNF-R, и FAS-R, играя определенную роль, например, в передаче сигналов, инициируемой посредством связывания TNF с рецептором TNF и FAS-лиганда с рецептором FAS. В качестве примеров могут служить белки, которые связываются с внутриклеточным доменом p75-TNF-R (p551C), такие, как белки, обозначенные в настоящем описании 55.1, 55.3 и 55.11 (Пример 1), а также белки, кодируемые кДНК-клонами F2, F9 и DD11 (Пример 3); белки, которые связываются с внутриклеточным доменом p75-TNF-R (p751C), такие, как белки, обозначенные 75.3 и 75.16 (Пример 1); и белки, которые связываются с внутриклеточным доменом FAS-R (FAS-1C), такие, как белки, кодируемые кДНК-клонами F2, F9 и DD11 (Пример 3). Было установлено, что белки 55.1 и 55.3 представляют собой части или фрагменты внеклеточного домена p55-TNF-R, (p551C); а другие белки, а именно, 55.11, 75.3 и 75.16, не были вообще описаны до настоящего изобретения (75.3, 75.16), либо они были описаны (55.11, см., Khan и др., 1992), но об их функциях или других свойствах, в частности, о способности связываться с TNF-R ничего не сообщается (см. ниже, Пример 1). Новые белки, кодируемые кДНК-клонами F2, F9 и DD11 также представляют собой белки, которые ранее не были описаны, т.е., их последовательности отсутствуют в банках данных с ДНК ("GENEBANK") или в банках данных о аминокислотных последовательностях ("PROTEIN BANK").

Таким образом, настоящее изобретение относится к ДНК-последовательностям, кодирующим указанные белки, и к белкам, кодируемым этими ДНК-последовательностями.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к ДНК-последовательностям, кодирующим биологически активными {аналоги и производные этих белков, и к аналогам и производным, кодируемым этими последовательностями. Получение указанных аналогов и производных осуществляют стандартными методами (см., например Sambrook и др., 1989), где, в ДНК-последовательностях, кодирующих эти белки, могут быть делетированы, добавлены, или заменены один или несколько кодонов, так, чтобы полученный в результате аналог имел изменение, по крайней мере, в одной аминокислоте по сравнению с нативным

белком. Приемлемыми аналогами являются такие аналоги, которые сохраняют, по крайней мере, свою способность к связыванию с внутриклеточным доменом рецептора, принадлежащего к суперсемейству рецепторов TNF/NGF, таких, как FAS-R, или TNF-R, например, p551C, p751C, или FAS-1C, или которые могут опосредовать любое другое связывание или ферментативную активность, например, такие аналоги, которые связываются с p55, p751C или FAS-1C, но которые не передают сигнал, т.е., не связываются с другим ниже расположенным рецептором, белком или другим фактором, или не катализируют сигнал-зависимую реакцию. Таким образом, могут быть продуцированы аналоги, которые обладают так называемым преобладающим негативным эффектом, а именно, аналоги, которые являются дефектными либо в отношении связывания, например, с p551C, p751C или FAS-1C, либо в отношении последующей передачи сигнала после связывания. Эти аналоги могут быть использованы, например, для ингибирования действия TNF или FAS-лиганда путем конкуренции с натуральными 1C-связывающими белками. Аналогичным образом, могут быть продуцированы так называемые доминантно-позитивные аналоги, которые обладают способностью усиливать действие, например, TNF или FAS-лиганда. Эти аналоги должны иметь аналогичные или даже лучшие 1C-связывающие свойства, а также аналогичную или даже лучшую способность к передаче сигнала, чем натуральные 1C-связывающие белки. Аналогичным образом, производные могут быть получены путем стандартных модификаций боковых групп одного или нескольких аминокислотных остатков белков, или путем конъюгирования белков с другой молекулой, например, с антителом, ферментом, рецептором и другими молекулами, хорошо известными специалистам.

Новые белки, связывающиеся с внутриклеточным доменом TNF-R, и FAS-R, например, белки 55.1, 55.3, 55.11, 75.3, 75.16 а также белки, кодируемые кДНК-клонами F2, F9 и DD11 (обозначаемых далее F2, F9 и DD11) могут быть использованы в различных целях, например:

i) Они могут быть использованы для имитации или усиления функции TNF или FAS-R-лиганда в тех случаях, когда усиленное действие TNF или FAS-R является желательным, например, при противоопухолевой, противовоспалительной или анти-ВИЧ терапии, где необходимо достичь TNF- или FAS-R-лиганд-индуцированной цитотоксичности. В этих случаях, белки, например, белки, связывающиеся с p551C, такие, как 5.1, 55.3, а также F2, F9 и DD11, и непосредственно сам p551C (см. ниже, и Пример 2), а также "домен смерти" p551C (p55DD), который усиливает действие TNF; либо белки F2, F9 и DD11, а также FAS-1C и FAS-DD, которые усиливают действие FAS-R-лиганда, т.е., обладают цитотоксическим действием, могут быть введены в клетку с использованием стандартной техники, известной *per se*. Так, например, поскольку эти белки являются внутриклеточными, и поскольку желательно, чтобы они были введены только в те клетки, где предпочтительно индуцировать действие TNF или FAS-R-лиганда, то для специфического введения этих белков в клетки необходимо использовать определенную систему. Одним из способов конструирования такой системы является создание рекомбинантного вируса животного, например, вируса, происходящего от вируса коровьей оспы, для получения ДНК, из которой могут быть взяты и последовательно введены два гена: ген, кодирующий лиганд, который связывается с белками клеточной поверхности, экспрессируемыми клетками, например, такими, как белок gp120 вируса СПИДа (ВИЧ), который специфически связывается с некоторыми клетками (CD4-лимфоцитами и родственными клетками лейкозов) либо ген, кодирующий другой лиганд, который специфически связывается с клетками, несущими TNF-R или FAS-R, так, чтобы рекомбинантный вирусный вектор был способен к связыванию клеток, несущих TNF-R или FAS-R; и ген, кодирующий новый белок, связывающийся с внутриклеточным доменом, или белок p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD. Таким образом, белок на поверхности вируса, связывающийся с клеточной поверхностью, будет специфически направлять этот вирус на опухолевую клетку или на другую клетку, несущую TNF-R или FAS-R, после чего последовательность, кодирующая белок, связывающийся с внутриклеточным доменом, или последовательность, кодирующая p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, будет введена в клетки с помощью этого вируса, а после ее экспрессии в этих клетках, будет индуцироваться усиление действия TNF или FAS-R-лиганда, что приведет к гибели опухолевых клеток, или других клеток, несущих TNF-R или FAS-R, уничтожение которых было бы желательным. Конструирование такого рекомбинантного вируса животных может быть осуществлено с использованием стандартной техники [см., например, Sambrook и др., 1989]. Другая возможность введения указанных белков в клетки может быть реализована путем введения последовательностей этих новых белков или p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD в форме олигонуклеотидов, которые могут быть абсорбированы клетками и экспрессированы в них.

ii) Они могут быть использованы для ингибирования действия TNF или FAS-R-лиганда, например, в случаях разрушения ткани в результате септического шока, реакции отторжения типа "трансплантат против хозяина", или острого гепатита, где необходимо блокировать TNF-индуцированную внутриклеточную передачу сигнала TNF-R или FAS-R-лиганд индуцированную внутриклеточную передачу сигнала FAS-R. В этом случае, можно, например, ввести в клетки, с помощью стандартной техники, олигонуклеотиды, имеющие антисмысловые кодирующие последовательности для этих новых белков, или антисмысловые кодирующие последовательности для p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, которые могли бы эффективно блокировать трансляцию мРНК, кодирующих эти белки, и тем самым блокировать их экспрессию, что, в конечном счете, привело бы к ингибированию действия TNF или FAS-R-лиганда.

Такие олигонуклеотиды могут быть введены в клетки с использованием вышеописанного вируса; причем, второй последовательностью, содержащейся в этом вирусе, должна быть олиго-нуклеотидная последовательность. Другим способом является использование антител против указанных белков, которое приведет к ингибированию их способности к внутриклеточной передаче сигнала. Возможно, что эти новые белки имеют внеклеточный домен и внутриклеточный домен, при этом, внутриклеточный домен связывается с TNF-R- или FAS-R-связывающим доменом, и тогда антитела, генерированные против их внеклеточных доменов, могут быть использованы для блокирования TNF или FAS-R-ассоциированных функций.

Еще одним способом ингибирования действия TNF или FAS-R-лиганда является недавно разработанный метод с использованием рибозимов. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК, которые специфически расщепляют РНК (т.е., обладают свойством автокатализа). Рибозимы могут быть

сконструированы для расщепления нужных РНК, например, мРНК, кодирующих новые белки настоящего изобретения, или мРНК, кодирующие р551С, р55DD, FAS-1С или FAS-DD. Такие рибозимы должны иметь последовательность, специфичную для выбранной мРНК, а также должны обладать способностью к взаимодействию с ней (комплементарное связывание) с последующим расщеплением этой мРНК, что должно, в конечном счете, приводить к снижению (или полному подавлению) экспрессии белка, который необходимо ингибировать, причем, уровень снижения экспрессии зависит от уровня экспрессии рибозимы в клетке-мишени. Для введения рибозимов в выбранные клетки (например, в клетки, несущие TNF-R или FAS-R) может быть использован любой подходящий вектор, например, плаزمид, вирусные векторы животных (ретровирусы), и векторы, которые обычно используются в этих целях (см., выше, где вирус имеет, в качестве второй последовательности, кДНК, кодирующую выбранную последовательность рибозима). Кроме того, могут быть сконструированы рибозимы, имеющие множество мишеней (многоцелевые рибозимы), которые могут быть использованы, например, для ингибирования экспрессии одного или нескольких белков настоящего изобретения и/или р551С, р55DD, FAS-1С или FAS-DD, обзор методом и т.п., посвященных рибозимам, [см., 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].

iii) Они могут быть использованы для выделения, идентификации и клонирования других белков, способных связываться с ними, например, других белков, участвующих в процессе передачи сигнала, которые находятся ниже от внутриклеточного домена TNF-R или FAS-R. В этом случае, указанные варианты, а именно ДНК-последовательности, кодирующие эти белки, могут быть использованы в дрожжевой двухгибридной системе (см. Пример 1), в которой последовательность этих белков может быть использована в качестве "приманки" для выделения, клонирования и идентификации из библиотек кДНК или геномной ДНК других последовательностей ("добычи"), кодирующей белки, которые могут связываться с этими новыми белками, связывающимися с внутриклеточными доменами TNF-R или FAS-R. Аналогичным способом может быть также определено могут ли конкретные белки настоящего изобретения, а именно, белки, которые связываются с р551С, р75С или FAS-1С, связываться с другими рецепторами суперсемейства рецепторов TNF/NGF. Например, недавно сообщалось [Schwalb и др., 1993; Boens и др., 1993, Crowe и др., 1994], что помимо р55- и р75-TNF-R, существуют и другие рецепторы TNF. В соответствии с этим, используя дрожжевую двухгибридную систему, можно точно проверить обладают ли белки настоящего изобретения способностью к специфическому связыванию с этими другими TNF-рецепторами или другими рецепторами суперсемейства TNF/NGF. Кроме того, этот способ, может быть, также использован для определения обладают ли белки настоящего изобретения способностью связываться с другими известными рецепторами, в активности которых они могут играть функциональную роль.

iv) Эти новые белки могут быть также использованы для выделения, идентификации и клонирования других белков того же самого класса, т.е., белков, связывающихся с внутриклеточными доменами TNF-R или FAS-R или с функционально родственными рецепторами, и участвующими во внутриклеточной передаче сигнала. В этом случае, может быть использована вышеописанная дрожжевая двухгибридная система, либо может быть использована недавно разработанная (Wilks и др., 1989) система с применением нестрогой Саузерн-гибридизации с последующим PCR-клонированием. В публикации Wilks и др. описываются идентификация и клонирование двух предполагаемых протеин-тирозин-киназ с использованием нестрогой Саузерн-гибридизации с последующим клонированием посредством PCR исходя из известной последовательности "мотива" киназы предполагаемой киназной последовательности. В соответствии с настоящим изобретением, этот метод может быть применен с использованием последовательностей новых белков для идентификации и клонирования белков, родственных белкам, связывающимся с внутриклеточным доменом TNF-R, FAS-R или родственного рецептора (рецепторов суперсемейства TNF/NGF).

v) В еще одном варианте, новые белки настоящего изобретения могут быть использованы в методах аффинной хроматографии для выделения и идентификации других белков или факторов, с которыми они способны связываться, например, других рецепторов, родственных TNF-R (рецепторам суперсемейства TNF/NGF) или других белков или факторов, участвующих в процессе передачи сигнала. В этом случае, белки настоящего изобретения могут быть отдельно связаны с матриксом, используемым для аффинной хроматографии, а затем подвергнуты контакту с клеточными экстрактами или выделенными белками или факторами, которые подозреваются в участии в процессе передачи внутриклеточного сигнала. После проведения аффинной хроматографии, другие белки или факторы, которые связываются с новыми белками настоящего изобретения, могут быть проэлюированы, выделены и охарактеризованы.

vi) Как указывалось выше, новые белки настоящего изобретения могут быть также использованы в качестве иммуногенов (антигенов) для продуцирования антител против них. Эти антитела могут быть также использованы для очистки новых белков либо из клеточных экстрактов, либо из продуцирующих их трансформированных клеточных линий. Кроме того, эти антитела могут быть также использованы в диагностических целях идентификации расстройств, связанных с аномальным функционированием системы TNF или FAS-R-лиганда, например, клеточных эффектов, индуцированных сверхактивными или малоактивными TNF или FAS-R-пигандами. Так, например, в случае, когда такие расстройства связаны с недостаточным функционированием системы передачи внутриклеточного сигнала, в которой участвуют новые белки, указанные антитела могут служить важным диагностическим инструментом.

При этом следует отметить, что выделение, идентификация и характеристика новых белков настоящего изобретения могут быть осуществлены с помощью хорошо известных стандартных методов скрининга. Так, например, один из таких методов скрининга (метод с получением двойного дрожжевого гибрида, как описано ниже в Примерах 1 и 3) был использован для идентификации новых белков настоящего изобретения. Как описано выше и ниже, могут быть использованы другие хорошо известные методы, такие, как аффинная хроматография, ДНК-гибридизация, и т.п. для выделения, идентификации и характеристики новых белков настоящего изобретения, или для выделения, идентификации и характеристики других белков, факторов, рецепторов и т.п., обладающих способностью связываться с новыми белками настоящего изобретения или с

рецепторами, принадлежащими к семейству рецепторов TNF/NGF.

Что касается вышеупомянутых антител, то термин "антитело", используемый в настоящем описании, означает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), химерные антитела, антиидиотипические антитела (анти-1d), против антител, которые могут быть помечены в растворимой или связанной форме, а также к их фрагментам, полученным с использованием известной техники, такой, как ферментативное расщепление, пептидный синтез или техника рекомбинантных ДНК, и т.п.

Поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сыворотки животных, иммунизированных антигеном. Моноклональные антитела представляют собой, в основном, гомогенную популяцию антиген-специфических антител, которые имеют, в основном, аналогичные эпитопсвязывающие сайты. Моноклональные антитела могут быть получены известными методами. [См., например, Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); патент США №4 376 110; Ausubel et al., eds., Harlow & Lane *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Gold Spring Harbor Laboratory (1988); и Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene publishing Assoc. & Wiley Interscience N. Y., (1992, 1993)], причем, содержимое этих работ вводится в настоящее описание посредством ссылки. Указанными антителами могут быть любые иммуноглобулины классов 1gG, 1gM, 1gE, 1gA, GULD, и любых их подклассов. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела настоящего изобретения могут быть культивированы *in vitro*, *in situ*, *in vivo*. Возможность продуцирования высокого титра моноклональных антител *in vitro* или *in situ* делает этот метод особенно предпочтительным.

Химерные антитела представляют собой молекулы, состоящие из разных частей, происходящих от разных видов животных, например, такие молекулы, которые имеют переменную область, происходящую от мышинных mAb, и константную область, происходящую от человеческого иммуноглобулина. Химерные антитела используют, главным образом, для снижения иммуногенности и для увеличения выхода при продуцировании, например, такие химерные человек/мышинные mAb могут быть использованы в тех случаях, когда мышинные mAb имеют повышенные выходы из гибридом, но обладают повышенной иммуногенностью для человека. Химерные антитела и способы их получения являются известными и описаны в литературе [Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312: 643-646 (1984); Cabilly et al., заявка на Европейский патент 125023 (опубликованная 14 ноября 1984); Neuberger et al., *Nature* 314: 268-270 (1985); Morrison et al. Заявка на Европатент 173494 (опубл. 5 марта 1986) Taniguchi et al., заявка на Европейский патент 173494 (опубликованная 5 марта 1986.), Neuberger et al., PCT заявка WO 8601533 (опубликованная 13 марта 1986); Kudo и др. заявка на Европейский патент 184187 (опубликованная 11 июня 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson и др. заявка на Международный патент WO 8702671 (опубликованная 7 мая 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218 (1987); Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988); и Harlow & Lane., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*. (см. выше)]. Все указанные работы вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Антиидиотипическое (анти-1d) антитело представляет собой антитело, распознающее антигенные детерминанты, в основном, ассоциированные с антигенсвязывающим центром антитела. Идиотипическое антитело может быть получено путем иммунизации животного того же вида и генетического типа (например, мышинной линии), что и источник mAb, моноклональное антителом, к которому продуцируют анти-1d антитело. Иммунизированные животные могут распознавать и реагировать на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела путем продуцирования антител к указанным идиотипическим детерминантам (анти-1d антител). [См., например, патент США 4 699 880], который вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Антиидиотипическое антитело может быть также использовано в качестве "иммуногена" для индуцирования иммунного ответа у другого животного, продуцирующего так называемое анти-антиидиотипическое антитело. Это анти-антиидиотипическое антитело может быть по своим антигенным детерминантам идентичным исходному mAb, которое индуцирует антиидиотипическое антитело. Таким образом, путем использования антител к идиотипическим детерминантам mAb могут быть идентифицированы другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

В соответствии с этим, моноклональные антитела, продуцированные против 1C-связывающих белков, их аналогов или производных настоящего изобретения или против p551C, p55DD, FAS-DD, 1C, FAS-DD, их аналогов или производных, могут быть использованы для генерирования антиидиотипических антител у соответствующих животных, такие, как мыши BALB/c. Клетки селезенки от этих иммунизированных мышей используют для продуцирования анти-1d гибридом, секретирующих анти-1d mAb. Кроме того, эти анти-1d mAb могут быть конъюгированы с носителем, таким, как гемоцианин лимфы улитки (KLH), и использованы для иммунизации других мышей BALB/c. Сыворотки этих мышей будут содержать анти-антиидиотипические антитела, обладающие связывающими свойствами исходного mAb, специфичного к эпитопу вышеуказанного 1C-связывающего белка, его аналогов или производных, а также p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, их аналогов или производных.

Таким образом, анти-1d mAb имеют свои собственные идиотипические эпитопы, или "идиотипы", структурно сходные с оцениваемым эпитопом, таким, как белок- α GPB.

Термин "антитело", используемый в настоящем описании, означает также интактные молекулы и их фрагменты, например, такие, как Fab и F(ab')₂, которые способны связываться с антигеном. Fab- и F(ab')₂-фрагменты представляют собой часть интактного антитела без Fc-фрагмента, и более быстро выводятся из кровотока и обладают меньшим ткане-неспецифическим связыванием, чем интактное антитело [Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)].

При этом следует отметить, что Fab-, F(ab)₂ - и другие фрагменты, применяемые в настоящем изобретении, могут быть использованы для обнаружения и количественной оценки 1C-связывающих белков или p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD в соответствии с методами, описанными в настоящей заявке для интактных молекул антитела. Обычно, эти фрагменты получают путем протеолитического расщепления с использованием таких ферментов, как папаин (для продуцирования Fab-фрагментов) или пепсин (для

продуцирования F(ab')₂-фрагментов).

Считается, что антитело "способно связываться" с молекулой в том случае, если оно способно вступать в специфическую реакцию с этой молекулой, в результате которой эта молекула связывается с антителом. Термин "эпитоп" означает часть любой молекулы, способной связываться с антителом, которая может распознаваться этим антителом. Эпитопы или "антигенные детерминанты" обычно состоят из химически активных групп поверхности молекул, таких, как группы аминокислотных остатков или боковые полисахаридные цепи, и имеют специфическую пространственную структуру, а также специфический заряд. "Антиген" представляет собой молекулу или ее часть, способную связываться с антителом, и способную, кроме того, индуцировать у животного выработку антител, способных связываться с эпитопом этого антигена. Антиген может иметь один или несколько эпитопов. Под понятием "специфическая реакция антигена" подразумевается, что этот антиген может реагировать при высоком уровне селективности с соответствующим ему антителом, и не может реагировать со многими другими антителами, продуцированными другими антигенами.

Антитела, включая фрагменты антител, применяемые в настоящем изобретении, могут быть использованы для количественного или качественного обнаружения 1С-связывающих белков или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD в образце, или для обнаружения присутствия клеток, которые экспрессируют 1С-связывающие белки настоящего изобретения или белки p551C, p55DD, FAS-1C, и FAS-DD. Это обнаружение может быть осуществлено с помощью иммуофлуоресцентной техники с использованием флуоресцентно меченных антител (см. ниже), в сочетании с методами оптической микроскопии, проточной цитометрии, или флуорометрии.

Антитела (или их фрагменты), применяемые в настоящем изобретении, могут быть использованы гистологически в иммуофлуоресцентной или иммуоэлектронной микроскопии для *in situ*-обнаружения 1С-связывающих белков настоящего изобретения или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD. *In situ* - детекция может быть осуществлена путем взятия гистологического образца у пациента, и введения меченного антитела настоящего изобретения в такой образец. Антитело (или его фрагмент) предпочтительно вводить путем нанесения или покрытия этим меченым антителом (или его фрагментом) биологического образца. Используя такой метод, можно определить не только присутствие 1С-связывающих белков или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD, но также и оценить распределение этих белков в исследуемой ткани. Любому специалисту совершенно очевидно, что с использованием настоящего изобретения можно модифицировать любые гистологические методы широкого ряда (например, методы окрашивания) для осуществления такой *in situ* детекции.

Указанные анализы на присутствие 1С-связывающих белков настоящего изобретения или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD обычно осуществляют путем инкубирования биологического образца, такого, как физиологическая жидкость, тканевый экстракт, свежеобработанные клетки, например, лимфоциты или лейкоциты, или клетки, которые были инкубированы в тканевой культуре, в присутствии детектируемого меченного антитела, способного к идентификации 1С-связывающих белков или p551C, p55DD, FAS-1C, FAS-DD, и последующего обнаружения этого антитела любым из имеющихся стандартных способов.

Биологический образец может быть иммобилизован на твердофазном носителе, таком, как микроцеллюлоза или другой твердофазный носитель, способный иммобилизовывать клетки, частицы клеток, или растворимые белки. Этот носитель может быть затем промыт соответствующими буферами, а после этого обработан детектируемым меченым антителом в соответствии с настоящим изобретением, как указано выше. Твердофазный носитель может быть, затем еще раз промыт буфером для удаления несвязанного антитела. После этого, количество связанной метки на указанном твердом носителе или подложке может быть определено стандартными методами.

Термины "твердофазная подложка", "твердофазный носитель", "твердый носитель", "твердая подложка", "подложка" или "носитель" означает любую подложку или любой носитель, способные связываться с антигеном или антителами. Хорошо известными подложками или носителями являются стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, декстран, нейлон, амилазы, натуральные и модифицированные целлюлозы, полиакриламиды, габбро и магнетит. По своей природе, этот носитель может быть растворимым до определенной степени, либо нерастворимым в зависимости от целей настоящего изобретения. Материал для носителя может иметь фактически любую конфигурацию, при условии, что иммобилизованная на нем молекула способна связываться с антигеном или антителом. Так, например, подложка или носитель может иметь сферическую в виде шариков) и цилиндрическую (в виде внутренней поверхности лабораторной пробирки) конфигурацию, или представлять собой внешнюю поверхность стержня. Альтернативно, поверхность носителя может быть плоской, такой, как лист, полоска, и т.п. Предпочтительными носителями являются полистироловые шарики. Однако, при этом следует отметить, что путем рутинного экспериментирования, любой специалист может самостоятельно подобрать подходящие носители для связывания антитела или антигена.

Связывающая активность данного антитела, описанного выше, может быть определена известными методами. При этом, каждый специалист, посредством рутинного экспериментирования, может определить рабочие и оптимальные условия анализа для каждого конкретного случая.

В каждом конкретном случае анализа могут быть дополнительно осуществлены другие стадии, такие, как промывка, размешивание, фильтрация и т.п., если это необходимо.

Один из способов получения детектируемого меченного антитела настоящего изобретения предусматривает связывание этого антитела с ферментом с последующим проведением иммуоферментного анализа (ИФА). Этот фермент, в свою очередь, может быть, подвергнут затем взаимодействию с соответствующим субстратом, так, чтобы в результате этой реакции с субстратом продуцировалась химическая молекула или группа, которая могла бы быть обнаружена методами спектрофотометрии, флуорометрии, или путем визуального наблюдения. Ферментами, которые могут быть использованы для получения детектируемого меченного антитела, являются (но не ограничиваются ими) малатдегидрогеназа,

стафилококковая нуклеаза, стероид- S-изомераза, дрожжевая алкогольдегидрогеназа, альфа-глицерофосфат-дегидрогеназа, триозофосфатизомераза, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, аспарагиназа, глюкозооксидаза, бета-галактозидаза, рибонуклеаза, уреаза, каталаза, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, глюкоамилаза и ацетилхолинэстераза. Детекция антитела может быть осуществлена колориметрическими методами, в которых используется хромогенный субстрат для фермента. Детекция может быть также осуществлена путем визуального сравнения степени ферментативной реакции субстрата со стандартами, изготовленными аналогичным образом.

Детекция может быть также осуществлена с использованием любого другого иммуноанализа. Так, например, радиоактивно меченные антитела или их фрагменты могут быть обнаружены по R-РТРазе с использованием радиоиммунологического анализа (РИА). Хорошее описание РИА приводится [Work T. и др., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology; Noeth Holland Publishing Company NY (1978) со ссылкой на главу под названием "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques", Chard T.]; указанная работа вводится в настоящее описание посредством ссылки. Радиоактивный изотоп может быть обнаружен с помощью гамма-счетчика, сцинтилляционного счетчика, или с помощью автордиографии.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело может быть также помечено флуоресцентным соединением. При этом, если флуоресцентно меченное антитело подвергнуть световому облучению с соответствующей длиной волны, то присутствие этого антитела может быть обнаружено благодаря флуоресценции. Наиболее распространенными соединениями, применяемыми для флуоресцентного мечения, являются изотиоцианат флуоресцеина, родамин, фикоэритрин, пикоцианин, аллофикоцианин, о-фталальдегид, и флуорескамин.

Антитело, для его обнаружения, может быть также помечено с использованием флуоресцирующих металлов, таких, как ^{152}E или других металлов ряда лантанидов. Эти металлы могут быть связаны с антителом посредством групп, образующих хелатные комплексы металлов, например, таких групп, как диэтилтриаминпентауксусная кислота (ЕТРА).

Для своего обнаружения, антитело может быть также помечено путем его связывания с хемолюминисцентным соединением. Присутствие такого хемилюминесцентно-меченного антитела может быть, затем обнаружено по наличию люминесценции, продуцируемой в результате химической реакции. Примерами подходящих хемилюминесцентных соединений-меток являются люминол, изолюминол, термоустойчивый сложный эфир акридиния, имидазол, соли акридиния и сложный эфир акридиния и щавелевой кислоты.

Аналогичным образом, биолюминесцентное соединение также может быть использовано для мечения антитела настоящего изобретения. Биолюминесценция является одним из видов хемилюминесценции, наблюдаемой в биологических системах, где каталитический белок усиливает эффективность хемилюминесцентной реакции. Присутствие биоллюминесцентного белка может быть обнаружено по наличию люминесценции. Подходящими для мечения биоллюминесцентными соединениями являются люциферин, люцифераза и экзурин.

Молекула антитела настоящего изобретения может быть адаптирована для использования в иммунометрическом анализе, известном под названием "двухслойного" (или "двухстадийного") анализа или "сэндвич"-анализа. В типичном иммунометрическом анализе, определенное количество немеченого антитела (или его фрагмента) связывают с твердой подложкой или с твердым носителем, и добавляют определенное количество детектируемого меченного растворимого антитела, после чего анализируют на присутствие и/или определяют количество тройного комплекса, образующегося между антителом, иммобилизованным на твердофазном носителе, антигеном и меченым антителом.

Обычно и предпочтительно, иммунометрический анализ представляет собой "прямой" анализ, в котором антитело, связанное с твердофазным носителем, сначала подвергают контакту с тестируемым образцом для экстракции антигена из этого образца посредством образования двойного комплекса "антитело на твердофазном носителе - антиген". После инкубирования в течение соответствующего периода времени, твердый носитель промывают для удаления остатков жидкого образца, включая непрореагировавший антиген, если таковой имеется, и подвергают контакту с раствором, содержащим неизвестное количество меченного антитела (которое функционирует как "репортерная молекула"). После второго периода инкубирования, во время которого меченое антитело образует комплекс с антигеном, связанным с твердой фазой посредством немеченого антитела, твердый носитель промывают второй раз в целях удаления непрореагировавшего меченого антитела.

В "сэндвич"-анализе другого типа, который также может быть применен в антигенах настоящего изобретения, используют так называемый "одновременный" и "обратный" анализы. Одновременный анализ предусматривает одну стадию инкубирования, поскольку антитело, связанное с твердым носителем, и меченое антитело добавляют к тестируемому образцу одновременно. После завершения стадии инкубирования, твердый носитель промывают для удаления остатков жидкого образца и неконъюгированного меченого антитела. Затем присутствие меченого антитела, связанного с твердым носителем, определяют так же, как и в "прямом" анализе, описанном выше.

В "обратном" анализе, сначала добавляют раствор меченого антитела к жидкому образцу, а затем, после соответствующего периода инкубирования, добавляют немеченое антитело, связанное с твердым носителем. После второго инкубирования, твердую фазу промывают стандартным способом для удаления остатков тестируемого образца и раствора непрореагировавшего меченого антитела. Определение меченого антитела, связанного с твердым носителем, осуществляют как в "одновременном" и "прямом" анализах.

Новые белки настоящего изобретения, после их выделения идентификации, и характеристики любым из стандартных методов скрининга, например, методом с использованием дрожжевого двойного гибрида, аффинной хроматографии и других известных методов, могут быть, затем продуцированы стандартными методами ре-комбинантных ДНК [см., например, Sambrook и др., 1989], в которых подходящие эукариотические или прокариотические клетки-хозяева трансформируют соответствующими

эукариотическими или прокариотическими векторами, содержащими последовательности, кодирующие белки. В соответствии с этим, настоящее изобретение также относится к указанным экспрессирующим векторам и трансформированным клеткам-хозяевам. Как упоминалось выше, к этим белкам также относятся их биологически активные аналоги и производные, а поэтому, настоящее изобретение также относится к векторам, кодирующим аналоги этих белков; и к трансформированным клеткам-хозяевам, продуцирующим эти аналоги. Производные указанных белков получают путем стандартной модификации белков или их аналогов, продуцируемых трансформированными клетками-хозяевами.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к использованию отдельного внутриклеточного домена p55-TNF-R (p551C) или FAS-R (FAS-1C) или их так называемых "доменов смерти" (p55DD) или FAS-DD, соответственно в качестве агентов для усиления действия TNF или FAS-R-лиганда на клетки, независимо друг от друга (см. Пример 2). Если в данных клетках, например, в раковых или ВИЧ-инфицированных клетках, необходимо генерировать TNF- или FAS-R-лигандиндуцируемый цитотоксический эффект, то в эти клетки могут быть введены p551C, p55DD или FAS-DD с использованием вышеописанной методики (см. выше п.(i)) с применением рекомбинантного вируса животных (например, вируса коровьей оспы). Кроме того, в настоящем изобретении могут быть использованы нативные p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, их биологически активные аналоги, производные или фрагменты, причем, все они могут быть получены методами, описанными выше.

Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к специфическому блокированию TNF-эффекта или FAS-R-лигандного действия путем ингибирования активности p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD, например, путем введения в клетки антисмыслового олигонуклеотида, приводящего к блокированию экспрессии p551C, p55DD, FAS-1C или FAS-DD.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим рекомбинантные векторы на основе вирусов животных, кодирующие белки, связывающиеся с внутриклеточным доменом рецептора TNF или FAS (включая p551C, p55DD, FAS-1C и FAS-DD), а также кодирующие вирусные поверхностные белки, способные специфически связываться с поверхностными белками клеток-мишеней (например, раковых клеток), в результате чего, указанные векторы обеспечивают направленную инсерцию последовательностей белков, связывающихся с внутриклеточным доменом, в нужные клетки.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится, в частности, к эффектам самоассоциации внутриклеточного домена p55-TNF-рецептора (p55-1C, см. Пример 2). Примером таких эффектов, которые обычно опосредуются связыванием TNF со своим рецептором, и которые имитируются сигнал-передающей активностью самоассоциирующихся p55-1C или их частей, является индуцирование экспрессии гена, кодирующего 1L-8.

Интерлейкин-8 (1L-8) представляет собой цитокин, принадлежащий к подклассу хемокинов, обладающих выраженной хемотаксической активностью, и, как было показано, играющий важную роль в хемотаксисе гранулоцитов и клеток других типов, ассоциированных с рядом патологических состояний [см., например, Endo и др., 1994; Sekido и др., 1993; Harada и др., 1993; и Ferrick и др., 1991].

Фактор некроза опухолей (TNF) обладает полезной активностью, и поэтому, он может быть использован непосредственно для разрушения опухолевых клеток и вирус-инфицированных клеток, либо для усиления антибактериальной активности гранулоцитов. Однако, как указывалось выше, TNF также обладает нежелательной активностью, и в этих случаях, его активность желательно блокировать, включая, те случаи, когда используются повышенные дозы TNF, например, при противораковой, противовирусной и антибактериальной терапии.

В соответствии с этим, желательно разработать метод, который позволял бы регулировать активность TNF, либо получить такое соединение, которое было бы способно имитировать полезную активность TNF в клетках или тканях, нуждающихся в специальной обработке.

В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что самоассоциирующийся внутриклеточный домен p55-R (p55-1C) может, лиганд-независимым способом, имитировать ряд эффектов TNF, например, "домен смерти" p55-1C может индуцировать цитотоксические эффекты в клетках, а p55-1C может индуцировать экспрессию гена 1L-8. Таким образом, используя p55-1C, можно имитировать функцию TNF по сайт-направленному механизму, т.е., можно вводить p55-1C только в те клетки или ткани, которые нуждаются в обработке.

Одним из примеров вышеупомянутых методов может служить специфическая трансфекция (трансформация) опухолевых клеток или злокачественной ткани ДНК-молекулой, кодирующей p55-1C или его фрагмент, который может не только индуцировать цитотоксические эффекты на этих клетках или тканях, но и также усиливать эти эффекты путем ко-индукции 1L-8, которая будет приводить к аккумуляции в области этих клеток или тканей гранулоцитов или других лимфоцитов, которые, в свою очередь, могут способствовать разрушению опухолевых клеток или ткани. Этот метод позволяет избежать необходимости введения больших доз TNF, ассоциируемых с нежелательными побочными эффектами.

С использованием стандартной техники рекомбинантных ДНК могут быть получены различные участки p55-1C и определено, какая именно область ответственна за каждый TNF-индуцированный эффект. Например, было установлено, что "домен смерти" ответственен за цитотоксичность (Пример 2), и были получены различные другие конструкции, содержащие части p55-1C, которые (вместе с частью или полным "доменом смерти") могут быть ответственны за другие TNF-эффекты, и которые могут быть использованы, лиганд-независимым образом, после их самоассоциации, в целях индуцирования указанных эффектов, например индуцирования экспрессии 1L-8.

Следует отметить, что последовательность p55-1C, участвующая в индуцировании других TNF-ассоциированных эффектов (например индуцирование 1L-8), может отличаться от последовательности, которая ответственна за цитотоксичность, т.е., она может не иметь, или иметь только часть "домена смерти", и иметь другие "мотивы", происходящие из других участков внутриклеточного домена, либо она сама может

быть последовательностью этих других отличительных признаков последовательности (последовательностью другого "мотива"), участвующих в индуцировании других эффектов.

В соответствии с этим, как подробно описано выше и ниже, могут быть получены экспрессирующие векторы, содержащие указанные области р55-1С, их аналоги или производные, и экспрессированы в клетках-хозяевах, а затем очищены и проанализированы на их активность. В этом методе, могут быть получен ряд фрагментов р55-1С, обладающих одним или несколькими TNF-ассоциированными эффектами, и эти фрагменты могут быть использованы различным способом для лечения патологических состояний любого ряда, например, вирусных инфекций, бактериальных инфекций, опухолей, и т.п. Во всех указанных случаях, специфическая активность этих фрагментов может быть усилена путем совместного введения (или ко-трансфекции) фрагмента р55-1С, ответственного за индуцирование экспрессии гена IL-8, что приведет к желательной хемотаксической активности IL-8 и усилению деструкции клеток или тканей, которые необходимо разрушить.

Таким образом, не прибегая к системному введению TNF, можно индуцировать его полезные эффекты путем специфического введения всего р55-1С или его фрагмента в клетки или ткани, предназначенные для обработки.

р55-1С может быть специфически введен в клетки или ткани для их разрушения с использованием любого из вышеупомянутых способов. Так, например, один из этих способов предусматривает конструирование рекомбинантного вируса животного (например, происходящего от вируса коровьей оспы), в ДНК которого вводят два следующих гена: ген, кодирующий лиганд, который связывается с белками клеточной поверхности, специфически экспрессируемыми клетками, например, белком gp120 вируса СПИД'а, который специфически связывается с некоторыми клетками (CD4-лимфоцитами и родственными клетками лейкоза); либо другой лиганд, который специфически связывается с клетками, несущими TNF-R, и благодаря которому рекомбинантный вирусный вектор может связываться с такими TNF-R-несущими клетками; и ген, кодирующий р55-1С или его фрагмент. Таким образом, экспрессия белка, связывающегося с клеточной поверхностью, на поверхности вируса будет специфически направлять этот вирус на опухолевую клетку или на другую TNF-R-несущую клетку, в результате чего последовательность, кодирующая р55-1С или его фрагмент, будет, с помощью этого вируса, введена в клетки, и последующая экспрессия этой последовательности в указанных клетках приведет к усилению TNF-эффекта, способствующего гибели опухолевых или других TNF-R-несущих клеток, которые необходимо уничтожить, либо индуцирующего, например, экспрессию IL-8, приводящей к гибели этих клеток. Конструирование указанного рекомбинантного вируса животного может быть осуществлено с использованием стандартной техники [см., например, Sambrook и др., 1989]. Другой способ предусматривает введение последовательностей р55-1С или их фрагментов в виде олигонуклеотидов, которые могут быть абсорбированы клетками и экспрессированы в них.

Настоящее изобретение также относится, в частности, к фармацевтическим композициям, содержащим вышеуказанные рекомбинантные вирусные векторы, кодирующие р55-1С или его фрагменты, а также кодирующие поверхностный вирусный белок, способный специфически связываться с поверхностными белками клеток-мишеней (например, раковых клеток), в результате чего указанный вектор обеспечивает инсерцию последовательности р55-1С или его фрагментов в указанные клетки.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к новым синтетическим TNF-рецепторам, которые являются растворимыми, и обладают способностью к олигомеризации с образованием димерной, а возможно и более высокого порядка мультимерной TNF-рецепторной молекулы, каждая мономерная часть которой способна связываться с мономером TNF. Нативный TNF представляет собой гомотример, содержащий три активных TNF-мономера, каждый из которых способен связываться с одной молекулой рецептора; тогда, как природные рецепторы TNF представляют собой мономеры, каждый из которых способен связываться только с одним мономером гомотримерной TNF-молекулы. Таким образом, если TNF связывается с TNF-рецепторами на клеточной поверхности, то он способен связываться с тремя рецепторными молекулами, что приводит к образованию TNF-рецепторных кластеров, которые, очевидно, инициируют процесс передачи сигнала, приводящий, в конечном счете, к индуцированию наблюдаемых TNF-эффектов.

Хотя TNF обладает множеством полезных эффектов, таких, как способность к разрушению нежелательных клеток, например, опухолевых клеток или вирус-инфицированных клеток, а также к усилению антибактериальной активности гранулоцитов, однако, при этом, TNF обладает множеством нежелательных эффектов, например, таких, которые приводят к тяжелым заболеваниям, включая, аутоиммунные расстройства, ревматоидный артрит, реакция отторжения типа "трансплантат против хозяина" (отторжение трансплантата) и септический шок; причем, подозревается, что TNF является главной причиной патологической деструкции тканей. TNF может также вызывать чрезмерную потерю массы организма (кахексию) путем подавления активности адипоцитов. Кроме того, даже при введении TNF в целях использования его полезной активности, например, при лечении различных злокачественных опухолей или вирусных заболеваний, применяемые дозы TNF часто оказываются достаточно высокими и вызывают у пациента ряд нежелательных цитотоксических побочных эффектов, например, деструкцию здоровой ткани.

Поэтому, во всех вышеуказанных случаях, где действие TNF является неблагоприятным, желательно использовать эффективный ингибитор TNF. Было разработано множество TNF-блокирующих агентов, включая, растворимые белки, обладающие способностью связываться с TNF и ингибирующие связывание TNF с его рецепторами, и тем самым ингибирующие цитотоксическое действие TNF [см. EP 308378, EP 398327 и EP 568925]. Однако, эти TNF-связывающие белки, или растворимые TNF-рецепторы являются мономерными, а значит, каждый из них способен связываться лишь с одним из мономеров гомотримера TNF. Поэтому, блокирование функции TNF этими белками не может быть полным, поскольку, каждая молекула TNF, связанная с мономерным рецептором, имеет еще два свободных TNF-мономера, которые способны связываться с TNF-рецепторами клеточной поверхности, и тем самым способствовать неблагоприятному воздействию TNF на клетки.

Поэтому, для решения проблемы, связанной с блокированием функции TNF, в соответствии с настоящим изобретением был разработан метод, позволяющий сконструировать гибридные белки, а именно, растворимые олигомерные TNF-рецепторы, которые обладают способностью связываться, по крайней мере, с двумя мономерами нативной гомотримерной молекулы TNF. В соответствии с этим методом, указанные растворимые олигомерные рецепторы TNF связываются со своим TNF-лигандом с более высокой авидностью, чем известные ранее полученные растворимые TNF-связывающие белки или рецепторы. Так, например, если растворимый TNF-рецептор настоящего изобретения был получен в форме димера, то он способен связываться с двумя мономерами тримера TNF, что приводит к более полной и более продолжительной нейтрализации TNF вследствие более низкой скорости диссоциации димерных растворимых рецепторов из TNF. Кроме того, эти растворимые олигомерные рецепторы являются также более крупными молекулами, чем их мономерные аналоги, а поэтому, с фармацевтической точки зрения, они обладают большим преимуществом из-за вероятности того, что их выведение из организма будет более медленным.

Предпосылкой для разработки растворимых олигомерных рецепторов TNF настоящего изобретения было обнаружение того факта, что внутриклеточный домен p55-TNF-рецептора обладает способностью к самоассоциации, а также того факта, что в этом внутриклеточном домене (p55-1C) имеется участок, так называемый "домен смерти", который также обладает способностью к самоассоциации, и который непосредственно, лиганд-независимым образом, может вызывать цитотоксические эффекты на клетках (см. Пример 2). Используя такое свойство к самоассоциации внутриклеточного домена (p55-1C) и его "домена смерти", можно, с помощью стандартной техники рекомбинантных ДНК, сконструировать гибридный белок, содержащий, в основном, весь внеклеточный домен TNF-рецептора, такого, как рецептор p75-R или p55-R, а предпочтительно p55-R, и сшитый с ним, в основном, весь внутриклеточный домен (p55-1C) или его "домен смерти". Таким образом, можно сконструировать новый гибридный продукт, который на своем одном конце, имеет TNF-связывающий домен, т.е., внеклеточный домен рецептора, а на своем другом конце, имеет внутриклеточный домен, или его "домен смерти", способный к самоассоциации. В соответствии с этим, указанный продукт будет обладать способностью к олигомеризации благодаря самоассоциации между двумя его (а возможно и более) внутриклеточными доменами или "доменами смерти", что приведет к образованию олигомеров (или, по крайней мере, димеров), содержащих, по крайней мере, два домена, связывающихся с TNF.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением, было также обнаружено, что рецептор FAS/APO1 имеет самоассоциирующийся внутриклеточный домен, включая самоассоциирующий "домен смерти", обладающий определенной гомологией с p55-1C и его "доменом смерти" (Пример 2). Поэтому, в соответствии с настоящим изобретением можно сконструировать растворимые олигомерные TNF-рецепторы путем гибридизации внеклеточного домена TNF-рецептора (описанного выше) с внутриклеточным доменом или "доменом смерти" FAS/APO1-рецептора.

В обоих вышеуказанных случаях, олигомерные TNF-рецепторы настоящего изобретения являются растворимыми, благодаря лишь тому, что они имеют растворимый внеклеточный домен рецептора TNF и растворимый внутриклеточный домен или его "домен смерти" либо рецептора p55-TNF, либо рецептора FAS/APO1, т.е. они не содержат трансмембранный (нерастворимый) домен какого-либо из указанных рецепторов.

Подробное описание конструирования вышеуказанных олигомерных рецепторов TNF настоящего изобретения приводится ниже, в Примере". Однако, при этом, следует отметить, что после конструирования олигомерных рецепторов TNF настоящего изобретения может возникнуть ситуация, ранее не описанная, при которой внеклеточный домен рецептора TNF окажется способным к самоассоциации, и такая ситуация может быть нежелательной, поскольку, она будет препятствовать способности олигомерного рецептора связываться с двумя или более мономерами гомотримерной молекулы TNF, либо она может приводить к менее оптимальному связыванию этих мономеров TNF. Поэтому, во избежание таких ситуаций, можно, с помощью стандартной техники рекомбинантных ДНК, модифицировать внеклеточный домен TNF-рецептора, например, путем делеции или замещения одной или нескольких аминокислотных остатков, содержащихся в самоассоциирующейся области, в целях предупреждения возможной самоассоциации. Такая модификация внеклеточного домена TNF-рецептора является, поэтому, также частью настоящего изобретения, а модифицированные таким образом домены являются аналогами или производными внеклеточного домена рецептора TNF. Аналогичным образом, самоассоциирующий внутриклеточный домен (1C) или его "домен смерти" (DD) рецептора p55-R или рецептора FAS/APO1, используемый в олигомерных рецепторах TNF настоящего изобретения, также может быть аналогом или производным натурального домена, т.е., он может представлять собой любую модификацию последовательности p55-1C или ее фрагментов, включая, "домен смерти" (p55-DD), или любую модификацию последовательности внутриклеточного домена (FAS-1C) или его фрагментов рецептора FAS/APO1, включая "домен смерти" (FASDD), при условии, что в результате этих модификаций образуется самоассоциирующий продукт.

Аналогичным образом, после продуцирования и очистки, растворимые олигомерные рецепторы TNF, их аналоги или производные могут быть затем модифицированы стандартными химическими средствами для образования солей и функциональных производных в целях изготовления фармацевтических композиций, содержащих TNF-рецепторы настоящего изобретения в качестве активных ингредиентов.

Для продуцирования растворимых олигомерных TNF-рецепторов настоящего изобретения, из существующих клонов полного рецептора TNF получают ДНК-последовательности, кодирующие внеклеточный домен рецептора TNF, и таким же образом получают ДНК-последовательности, кодирующие внутриклеточный домен или его "домен смерти" рецептора TNF, а также внутриклеточный домен или его "домен смерти" рецептора FAS/APO1 (см. Пример 2 и Пример 5). Затем, ДНК-последовательность нужного внеклеточного домена лигируют с ДНК-последовательностью нужного внутриклеточного домена или его части, содержащей "домен смерти", и полученный таким образом гибридный продукт встраивают (и лигируют)

в соответствующий экспрессирующий вектор под контроль промотора или других регулирующих экспрессию последовательностей. После создания такого экспрессирующего вектора, этот вектор вводят в подходящие клетки-хозяева (т.е., эти клетки трансформируют, трансфецируют, и т.п. этим вектором), и после экспрессии указанного вектора в этих клетках получают гибридный продукт настоящего изобретения, который представляет собой растворимую самоассоциирующуюся молекулу рецептора TNF. Затем продуцированные таким образом молекулы выделяют из клеток-хозяев с помощью стандартной техники, и получают в качестве конечного продукта растворимые олигомерные рецепторы TNF.

В предпочтительном варианте, гибридные последовательности, кодирующие внеклеточный домен и внутриклеточный домен или его часть, получают с помощью PCR-методики с использованием олигонуклеотидов, специфических к данным целевым последовательностям, копируемым из клонов, кодирующих полную TNF-рецепторную молекулу. При этом можно использовать и другой способ, который заключается в выделении нужных участков, кодирующих внеклеточный домен и внутриклеточный домен, посредством рестриктирующих эндонуклеаз с последующим сплайсингом известным способом для их объединения, без модификации или с модификацией концов рестрикционных фрагментов для гарантии правильности лигирования нужных фрагментов рецептора (т.е., внеклеточного и внутриклеточного его доменов или их частей). Полученные таким образом гибридные продукты затем вставляют в выбранный вектор экспрессии.

Аналогично, настоящее изобретение также относится к растворимым олигомерным FAS/APO1 (FAS)-рецепторам, содержащим внеклеточный домен FAS/APO1-рецептора и самоассоциирующийся внутриклеточный домен p55-R (p55-1C) его "домен смерти" (p55DD), либо самоассоциирующийся внутриклеточный домен FAS/APO1-рецептора (FAS-1C) или его "домен смерти" (FAADD), или любые их аналоги или производные (см. выше). Ниже, в Примере 5 приводится подробное описание конструирования этих растворимых олигомерных FAS-рецепторов, где в качестве исходного материала использовали имеющуюся клонированную полноразмерную последовательность, кодирующую рецептор FAS и соответствующие олигонуклеотиды для PCR-продуцирования нужных внеклеточного и внутриклеточного доменов с последующим их лигированием для получения гибридного продукта, который затем встраивали в нужный экспрессирующий вектор. Как подробно описано выше и ниже, для продуцирования нужных растворимых олигомерных FAS-рецепторов могут быть использованы как прокариотические, так и эукариотические клетки-хозяева, а после продуцирования этих рецепторов, они могут быть очищены и использованы в качестве активных ингредиентов в фармацевтических композициях.

Вышеуказанные растворимые олигомерные FAS-рецепторы настоящего изобретения предназначены для эффективного блокирования FAS-лиганда, который может также существовать в виде тримера (аналогично TNF, см. выше), причем, каждый из олигомерных рецепторов настоящего изобретения способен связываться с двумя или более FAS-лигандами, и тем самым, нейтрализовывать их активность. Известно, что FAS-лиганд является, в основном, лигандом, ассоциированным с клеточной поверхностью, но, он может также существовать и в растворимой форме. В любом случае, олигомерные FAS-рецепторы настоящего изобретения способны связываться, по крайней мере, с двумя мономерами этого лиганда, и тем самым способствовать более эффективной (чем мономерные FAS-рецепторы) нейтрализации активности FAS-лиганда. FAS-лиганд, а следовательно, и активация FAS-рецептора, играет значительную роль в возникновении ряда патологических состояний, а в частности, состояний, связанных с повреждением печени (например, апоптоз гепатоцитов), включая повреждения печени, связанные с гепатитом, а также аутоиммунных состояний, включая разрушение (апоптоз) лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов [см., например, Ogasawara и др., 1993; Cheng, и др., 1994]. Поэтому, растворимые олигомерные FAS-рецепторы настоящего изобретения предназначены для блокирования активности FAS-лиганда, и могут быть использованы в качестве активного ингредиента в фармацевтических композициях для лечения таких FAS-лиганд-ассоциированных патологических состояний.

Аналогичным образом, настоящее изобретение также относится к растворимым олигомерным рецепторам, обладающих аффинностью связывания обоих TNF и FAS-R-лиганда, и представляющих собой так называемые "смешанные" олигомерные рецепторы TNF-R/FAS-R. Эти смешанные олигомерные рецепторы содержат, по крайней мере, один внеклеточный домен TNF-R, и по крайней мере, один внеклеточный домен FAS-R, которые объединяются в олигомерном рецепторе благодаря тому, что каждый из них присоединен к одному из вышеупомянутых самоассоциирующихся p551C, p55DD, FAS1C или FASDD.

Эти смешанные олигомерные рецепторы могут быть получены путем: a) продуцирования любого из вышеуказанных гибридных продуктов, которые содержат внеклеточный домен рецептора TNF-R (p75-TNF-R, или предпочтительно p55-TNF-R), сшитый с любым одним из самоассоциирующихся доменов p55-1C и FAS-1C или любым одним из самоассоциирующихся "доменов смерти" p55DD и FASDD, или любой его самоассоциирующейся частью, аналогом или производным; b) продуцирования любого из вышеуказанных гибридных продуктов, которые содержат внеклеточный домен FAS-R, сшитый с любым одним из самоассоциирующихся p551C: FAS-1C, p55DD и FASDD, либо с любыми его частями, аналогами или производными; и c) смешивания любого из TNF-специфических гибридных продуктов a) с любым из FAS-R-лиганд-специфических гибридных продуктов b) и получения (после стандартных процедур отбора и очистки) олигомерных (димеров или олигомеров более высокого порядка) рецепторов, содержащих, по крайней мере, оба внеклеточных домена TNF-R и FAS-R, которые связаны между собой благодаря способности к самоассоциации сшитых с ними областей 1C или DD.

Для получения вышеуказанных смешанных олигомерных рецепторов можно использовать и другой метод, который заключается в ко-трансформации подходящих клеток-хозяев вышеупомянутыми экспрессирующими векторами, один из которых кодирует TNF-специфические FAS-R-гибридные продукты, а другой кодирует FAS-R-лиганд-специфические FAS-R-гибридные продукты. После экспрессии этих разных гибридных продуктов в клетках-хозяевах, смешанные олигомерные (TNF-R/FAS-R) рецепторы могут быть получены посредством стандартных процедур очистки и отбора.

Ценность этих смешанных по своей аффинности олигомерных рецепторов заключается, в первую очередь, в том, что они нейтрализуют оба TNF и FAS-R-лиганда. в том случае, если наблюдается их чрезмерная эндогенная экспрессия, либо в том случае, если после их экзогенного введения, они присутствуют в слишком больших количествах. Недавно проведенные наблюдения указывают на вероятность того, что между функциями FAS-R-лиганда (обычно ассоциированного с клеточной поверхностью) и TNF- α (который также может быть ассоциирован с клеточной поверхностью) существует синергизм. Поэтому, в некоторых случаях желательно нейтрализовать оба эти лиганда в одном и том же месте клеточной поверхности, т.е., так, чтобы рецептор со смешанной аффинностью мог блокировать связывание TNF со своим рецептором и связывание FAS-R-лиганда со своим рецептором одновременно. В соответствии с этим, рецепторы со смешанной аффинностью могут быть использованы в качестве активного ингредиента в композициях, предназначенных для лечения таких состояний (см. выше), при которых активность TNF и FAS-R-лиганда является нежелательной.

Аналогично, в соответствии с приведенным выше описанием, относящимся к растворимым олигомерным TNF-R, и FAS-R, и смешанным TNF-R/FAS-R - олигомерам настоящего изобретения, можно также продуцировать растворимые олигомерные рецепторы других видов или смешанные рецепторы, происходящие от других видов рецепторов, а в частности, от любых других членов суперсемейства TNF/NGF. В этом случае, любые внеклеточные домены различных рецепторов могут быть присоединены к вышеупомянутым самоассоциирующимся внутриклеточным доменам или их фрагментам, либо к любым другим внеклеточным доменам членов суперсемейства, которые также обладают способностью к самоассоциации.

Экспрессия любого из вышеупомянутых белков настоящего изобретения может быть осуществлена в эукариотических клетках (например, в клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих) с использованием соответствующих экспрессирующих векторов. Для этих целей может быть применен любой из известных методов.

Так, например, ДНК-молекулы, кодирующие белки, полученные вышеописанным способом, могут быть встроены в специально сконструированные экспрессирующие векторы в соответствии со стандартной техникой [см. Sambrook и др., 1989]. Двухцепочечную ДНК лигируют с плазмидными векторами путем гомополимерного наращивания цепи или путем рестрикционного сшивания с использованием синтетических ДНК-линкеров или техники лигирования по затупленным концам. Для лигирования ДНК-молекул используют ДНК-лигазы, а нежелательные участки соединения устраняют путем обработки щелочной фосфатазой.

Для осуществления экспрессии нужного белка, экспрессирующий вектор должен также содержать специфические нуклеотидные последовательности, которые способны регулировать транскрипцию и трансляцию, и которые присоединяют к ДНК, кодирующей нужный белок, так, чтобы могла осуществляться экспрессия гена с последующим продуцированием нужного белка. Для того чтобы данный ген мог транскрибироваться, прежде всего, необходимо, чтобы этому гену предшествовал промотор, который распознается РНК-полимеразой, и с которым эта полимера связывается, иницируя, таким образом, процесс транскрипции. Существуют различные промоторы, которые действуют с разной эффективностью (сильные и слабые промоторы). Для прокариотических и эукариотических клеток используются разные промоторы.

Промоторы, которые могут быть использованы в целях настоящего изобретения, являются либо конститутивными (нерегулируемыми) промоторами, например, промотор *int* бактериофага Δ , промотор *b1a* гена β -лактамазы *rBP322*, и промотор *CAT* гена хлорамфениколацетилтрансферазы *rPP325*, и т.п., либо индуцируемыми промоторами, такими, как прокариотические промоторы, включая главные правый и левый промоторы бактериофага Δ (P_L и P_R), промоторы *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacJ*, *ompF*, и *gal* *E.coli*, или *trp-lac*-гибридный промотор, и т.п. [Glick B.P. (1987)]. Для достижения высоких уровней экспрессии гена в прокариотических клетках, помимо использования сильных промоторов, обеспечивающих продуцирование высоких количеств мРНК, необходимо также использовать сайты связывания с рибосомой для гарантии эффективной трансляции мРНК. В качестве примера может служить последовательность Шайна-Дальгарно (последовательность SD), предваряющая иницирующий кодон и комплементарная 3'-концу последовательности 16S-РНК.

Для эукариотических хозяев могут быть использованы различные транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности в зависимости от природы хозяина. Эти последовательности могут происходить от вирусных источников, таких, как аденовирус, вирус коровьей папилломы, обезьяний вирус, или т.п., где регуляторные сигналы ассоциируются с конкретным геном, который обладает высоким уровнем экспрессии. В качестве примеров могут служить промотор ТК вируса герпеса, ранний промотор вируса SV 40, промотор дрожжевого гена *GAL4*, и т.п. Регуляторные последовательности инициации транскрипции могут быть выбраны так, чтобы они позволяли осуществлять репрессию и активацию экспрессии генов в целях ее модуляции.

ДНК-молекулу, имеющую нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридные белки настоящего изобретения, вводят в вектор, имеющий соответствующим образом присоединенные транскрипционные и трансляционные регуляторные последовательности, способные интегрировать нужные генные последовательности в клетки-хозяева. Клетки, которые были стабильно трансформированы введенной ДНК, могут быть отобраны путем введения одного или нескольких маркеров, позволяющих проводить отбор клеток-хозяев, содержащих данный экспрессирующий вектор. Маркер может обеспечивать фототрофию ауксотрофным хозяевам, резистентность к биоциду, например, к антибиотикам или к тяжелым металлам, таким, как медь, и т.п. Селектируемый ген-маркер может быть либо непосредственно присоединен к экспрессируемой генной ДНК-последовательности, либо введен в ту же самую клетку путем ко-трансфекции. Для оптимального синтеза белков настоящего изобретения могут быть также введены дополнительные элементы. Такими элементами являются транскрипционные промоторы, энхансеры, и сигнал терминации. Векторы экспрессии кДНК, вводящие указанные элементы, [описаны Okayama H. (1983)].

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, введенную ДНК-молекулу встраивают в плазмиду или вирусный вектор, способный к автономной репликации в клетке-реципиенте. При отборе конкретной плазмиды или вирусного вектора, важными факторами являются: легкость распознавания и отбора клеток-реципиентов, содержащих данный вектор, из клеток, не содержащих этого вектора; число копий вектора, которое необходимо получить в данном конкретном хозяине; и тот факт, является ли желательным использовать "челночный" вектор, способный реплицироваться в клетках-хозяевах различных типов.

Предпочтительными прокариотическими векторами являются плазмиды, например, плазмиды, способные реплицироваться в *E.coli*, такие, как pBP322, ColE1, pSC101, pACYC 184, и т.п. [см. Maniatis и др., 1982; Sambrook и др., 1989]; плазмиды бацилл (*Bacillus*), такие, как pC194, pC221, pT127, и т.п. [Gryczan T. 1982]; плазмиды *Streptomyces*, включая pIJ101 [Kendall K.J. и др., 1987]; бактериофаги *Streptomyces*, такие, как ØC31 [Chater, K.F. и др., в: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, (1986); и плазмиды *Pseudomonas* (John, J.F. и др. 1986; и Izaki K., 1978)]. Предпочтительными эукариотическими плазмидами являются BPV, вирус коровьей оспы, Sv 40, 2-х микронное кольцо, и т.п., или их производные. Эти плазмиды хорошо известны специалистам [Botstein D. и др., 1982; Broach J.R., в: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*; Life Cycle and Inheritance (1981); Broach J.R. (1982); Bollon D.P. et al., (1980); Maniatis T., в: Cell Biology, A Comprehensive Treatise. Vol.3; Gene Expression, (1980); и Sambrook et al., 1989].

После получения вектора или ДНК-последовательности, содержащей конструкцию, предназначенную для экспрессии, эта ДНК-конструкция может быть введена в соответствующую клетку-хозяина любым из подходящих способов, например, путем трансформации, трансфекции, конъюгации, слияния протопластов, электропорации, осаждения фосфатом кальция, непосредственной микроинъекции, и т.п.

Клетки-хозяева, используемые в настоящем изобретении могут быть прокариотическими или эукариотическими. Предпочтительными прокариотическими хозяевами являются бактерии, такие, как *E.coli*, *Streptomyces*, Псевдомонады, Сальмонеллы, *Serratia* и т.п. Наиболее предпочтительными прокариотическими хозяевами являются *E.coli*. Из бактериальных хозяев, особый интерес представляют штамм *E.coli* K12 294 (ATCC 31446), *E.coli* X1776 (ATCC 31537), *E.coli* W3110 (F⁻, лямбда⁻, прототрофный (ATCC 27325)), и другие энтеробактерии, такие, как *Salmonella typhimurium* или *Serratia marcescens* и различные виды *Pseudomonas* в таких условиях, белок не будет гликозилирован. Прокариотические хозяева должны быть совместимыми с репликоном и регуляторными последовательностями в экспрессирующей плазмиде.

Предпочтительными эукариотическими хозяевами являются клетки млекопитающих, например, клетки человека, обезьян, мышей, и клетки яичника китайского хомячка, поскольку они обеспечивают посттрансляционную модификацию белковых молекул, включая, правильную ее укладку или гликозилирование в нужных сайтах. Дрожжевые клетки также способны осуществлять посттрансляционную модификацию пептидов, включая гликозилирование. Для продуцирования нужных белков в дрожжевых клетках существует ряд методов с применением технологии рекомбинантных ДНК, где используются сильные промоторы и высококопийные плазмиды. Дрожжевые клетки распознают лидерные последовательности на клонированных генных продуктах млекопитающих, и секретируют пептиды, несущие лидерные последовательности (т.е., пре-пептиды). После введения вектора, клетки-хозяева культивируют в селективной среде, используемой для отбора на рост векторсодержащих клеток. Экспрессия клонированных генных последовательностей приводит к продуцированию нужных белков.

Очистку рекомбинантных белков осуществляют любым из известных методов, обычно применяемых для этой цели, например, путем экстракции, преципитации, хроматографии, электрофореза, или т.п. Предпочтительным способом очистки белков настоящего изобретения является аффинная хроматография с использованием моноклональных антител против TNF-рецептора, иммобилизованных на гелевом матрикесе, содержащемся в колонке. Для этого, неочищенные препараты, содержащие рекомбинантный белок, пропускают через колонку. Белок связывается с колонкой с помощью специфических антител, тогда, как неочищенные белки будут проходить через колонку. После промывки, белок элюируют из геля путем изменения pH или ионной силы.

Как указывалось выше, термин "соли" относится к солям, образованным карбоксильными группами, и к кислым солям присоединения аминокислотной группы белковой молекулы, которые получают известными методами. Солями карбоксильной группы являются неорганические соли, например, натриевые и кальциевые соли, а также соли, образованные органическими основаниями, например, аминами, такими, как триэтанолламин, аргинин, или лизин. Кислыми солями присоединения являются, например, соли минеральных кислот и соли органических кислот.

Термин "функциональные производные", используемый в настоящем описании, относится к производным, которые могут быть получены путем модификации функциональных групп, присутствующих в качестве боковых цепей на аминокислотных остатках, или N-или C-концевых групп методами, хорошо известными специалистам, при этом, все такие производные входят в объем настоящего изобретения при условии, что они являются фармацевтически приемлемыми, т.е., они сохраняют активность исходного белка, и не наделяют токсическими свойствами содержащие их композиции. Такими производными являются алифатические сложные эфиры или амиды карбоксильных групп, и N-ацильные производные свободных аминокислот, или O-ацильные производные свободных гидроксильных групп, образованные ацильными группами (например, алканойльной или карбоциклической ароматической группами).

Термин "фрагмент", используемый в настоящем описании, относится к любой части или фрагменту рецептора (его внутриклеточному или внеклеточному доменам), или белка, связывающегося с внутриклеточным доменом рецептора, где указанные части или фрагменты сохраняют биологическую активность данного рецептора или белка.

Как указывалось выше, настоящее изобретение также относится к различным фармацевтическим композициям, содержащим фармацевтически приемлемый носитель и различные вышеописанные активные

ингредиенты настоящего изобретения или их соли, функциональные производные, или любые их смеси. Эти композиции могут быть использованы в любых из условий, описанных в настоящей заявке, например, в условиях сверхпродуцирования эндогенных TNF, например, при септическом шоке, кахексии, реакции отторжения по типу "трансплантат против хозяина", аутоиммунных заболеваниях, таких, как ревматоидный артрит, и т.п. Способ введения композиций настоящего изобретения может быть любым способом, приемлемым для введения подобных агентов, и зависит от цели и условий введения, так, например, если используемая композиция предназначена для ингибирования действия TNF, то она может быть введена внутривенно, например, в случае септического шока, или путем местной инъекции, например, в случае ревматоидного артрита (например, в колено), или непрерывно, путем вливания, и т.п. Композиции настоящего изобретения могут быть также использованы в случае TNF-интоксикации, вызванной экзогенным введением слишком высоких количеств (передозировкой) TNF, например, при противораковой или противовирусной терапии.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения получают путем смешивания белка или его производных с физиологически приемлемыми носителями, стабилизаторами и наполнителями, и изготавливают в виде лекарственной формы, например, путем лиофилизации в фармацевтических флаконах. Количество активного соединения, необходимое для введения, зависит от способа введения, конкретного заболевания, и состояния пациента. Так, например, местная инъекция при воспалении в случае ревматоидного артрита потребует меньшего количества активного ингредиента на массу тела, чем внутривенное вливание в случае септического шока.

Другие аспекты настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующих примеров.

Более подробно, настоящее изобретение изложено в нижеследующих примерах, не ограничивающих, однако, объема настоящего изобретения, и проиллюстрировано сопровождающими его рисунками.

Пример 1

Клонирование и выделение белков, связывающихся с внутриклеточными доменами рецепторов p55- и p75-TNF

Для выделения белков, взаимодействующих с внутриклеточными доменами p55- и p75-TNF-рецепторов (p551C и p751C), была использована дрожжевая двухгибридная система (Fields & Song, 1989). Эта двухгибридная система представляет собой генетический анализ с использованием дрожжевых клеток, проводимый для детекции специфических взаимодействий "белок-белок" *in vivo* путем восстановления эукариотического транскрипционного активатора, такого, как GAL4, имеющего два отдельных домена: "ДНК-связывающий домен" и "домен активации"; причем, при экспрессии этих доменов и их связывания друг с другом образуется репарированный белок GAL4, обладающий способностью связываться с вышерасположенной активирующей последовательностью, которая, в свою очередь, активирует промотор, контролирующей экспрессию "репортерного" гена, такого, как lacZ или HIS3, и эту экспрессию репортерного гена можно легко наблюдать в культивируемых клетках. В этом анализе, гены для кандидатов взаимодействующих белков клонировали в отдельных экспрессирующих векторах. В одном экспрессирующем векторе, последовательность одного белка-кандидата клонировали в соответствующей фазе с последовательностью ДНК-связывающего домена GAL4, в результате чего получали гибридный белок с ДНК-связывающим доменом GAL4, а в другом векторе, последовательность второго белка-кандидата клонировали в той же фазе с последовательностью домена активации GAL4, в результате чего получали гибридный белок с доменом активации GAL4. Затем эти двухгибридные векторы ко-трансформировали в дрожжевой штамм, имеющий "репортер-ный" ген lacZ или HIS3, регулируемый вышерасположенными сайтами связывания GAL4. В результате этого, лишь трансформированные клетки-хозяева (котрансформанты), в которых экспрессируются два гибридных белка, способные связываться друг с другом, будут экспрессировать репортерный ген. В случае использования репортерного гена lacZ, клетки-хозяева, экспрессирующие этот ген, будут окрашиваться в синий цвет при добавлении в культуру X-gal. Поэтому синий цвет колоний будет указывать на то, что два клонированных белка-кандидата способны взаимодействовать друг с другом.

Используя указанную двухгибридную систему, внутриклеточные домены p551C и p751C клонировали отдельно в вектор pGBT9 (несущий ДНК-связывающую последовательность GAL4; поставляется фирмой CLONTECH, USA, см. ниже), в результате чего получали гибридные белки с ДНК-связывающим доменом GAL4 (аналогичным образом, внутриклеточный домен, FAS-1C и часть p551C, а именно 55DD были клонированы также в pGBT9 и использованы для выделения других 1C-связывающих белков, см. ниже Пример 3). Для клонирования p551C и p751C в pGBT9, были использованы клоны, кодирующие полноразмерные кДНК-последовательности p55-TNF-R, [Schall и др., 1990] и p75-TNF-R [Smith и др., 1990], из которых были вырезаны внутриклеточные домены следующим образом: с помощью ферментов EcoRI и Sall вырезали p551C, после чего EcoRI-Sall-фрагмент, содержащий последовательность p551C, выделяли стандартным способом, и вставляли в вектор, рестриктированный, в области сайта множественного клонирования (MCS), ферментами EcoRI и Sall. p751C вырезали с использованием ферментов BspHI и Sall, после чего, BspHI-Sall-фрагмент, содержащий p751C-последовательность, выделяли стандартным способом, и застраивали фрагментом Кленова, в результате чего получали фрагмент, который вставляли в вектор pGBT9, рестриктированный ферментом SmaI и Sall.

Затем вышеописанные гибридные (химерные) векторы ко-трансфецировали (отдельно, одну ко-трансфекцию осуществляли с использованием p551C-гибридного вектора, и одну с использованием p75-гибридного вектора) вместе кДНК-библиотекой от клеток HeLa человека, клонированной в вектор pGAD GH, несущий домен активации GAL4, в дрожжевой штамм HF7с (все вышеуказанные векторы, pGBT9 и pGAD GH, несущий кДНК-библиотеку клеток HeLa, а также дрожжевой штамм получали из Clontech Laboratories, Inc., USA, как часть MATCHMAKER Two-Hybrid System, # PT1265-1). Ко-трансфецированные дрожжи отбирали на их способность к росту в среде, не содержащей гистидин (His⁻среда), при этом растущие колонии указывали на положительные трансформанты. Затем отобранные дрожжевые клоны анализировали на их способность экспрессировать ген lacZ, т.е., на их LACZ-активность, путем добавления X-gal в культуральную среду,

которая подвергается катаболизму с образованием окрашенного синим цветом продукта при участии β -галактозидазы, фермента, кодируемого геном *lacZ*. Таким образом, появление голубых колоний указывает на присутствие активного гена *lacZ*. Для того, чтобы ген *lacZ* был активен, необходимо, чтобы в трансформированных клонах активатор транскрипции GAL4 присутствовал в активной форме, а именно, чтобы ДНК-связывающий домен GAL4, кодируемый одним из вышеуказанных гибридных векторов, был правильно присоединен к домену активации GAL4, кодируемому другим гибридным вектором. Такая комбинация возможна лишь в том случае, когда два белка соединенные с каждым из доменов GAL4, способны к стабильному взаимодействию (связыванию) друг с другом. Таким образом, His^+ - и голубые (LACZ^+) колонии, которые были выделены, являются колониями, ко-трансфицированными вектором, кодирующим р551С, и вектором, кодирующим белковый продукт, происходящий от клеток HeLa человека, и способный стабильно связываться с р551С; или колониями, трансфицированными вектором, кодирующим Р751С, и вектором, кодирующим белковый продукт клеток HeLa, способный стабильно связываться с р751С.

Из вышеуказанных дрожжевых His^+ , LACZ^+ -колоний выделяли плазмидную ДНК, и вводили путем электропорации в штамм HB101 E.coli в соответствии со стандартной техникой, после чего осуществляли отбор Leu^+ - и ампициллин-устойчивых трансформантов, т.е., трансформантов, несущих гибридный вектор рGADGH, который содержит Amp^R - и Leu^2 -кодирующие последовательности. Поэтому, указанные трансформанты представляют собой клоны, несущие последовательности, кодирующие новые идентифицированные белки, способные связываться с р551С и р751С. Затем из этих трансформированных E.coli выделяли плазмидную ДНК и проводили повторное тестирование путем:

а) повторной трансформации этих клеток исходными гибридными плазмидами, содержащими внутриклеточный домен, (гибридной плазмидой рGTB9, несущей последовательность р551С или р75-1С) путем встраивания в дрожжевой штамм HF7, как описано выше. В качестве контроля для ко-трансформации плазмидами, кодирующими р551С-связывающий белок или р751С-связывающий белок, использовали векторы, несущие последовательности, несущие нерелевантный белок, например, рACT-ламин или один рGTB9. Затем ко-трансформированные дрожжи тестировали на рост на одной His^- -среде, или на среде с различными уровнями 3-аминотриазола; и

б) повторной трансформации плазмидой ДНК или исходных гибридных плазмид, и контрольных плазмид, описанных в (а), в дрожжевые клетки-хозяева штамма SFY526, и последующего определения LACZ^+ - активности (эффективности образования β -gal, т.е., развития голубой окраски).

Результаты вышеописанных тестов показали, что характер роста колоний в His^- -среде идентичен характеру LACG активности, о чем свидетельствовала окраска колоний, т.е., His^+ -колонии были также LACZ^+ . Кроме того, LACZ-активность в жидкой культуре (предпочтительные культуральные условия) оценивали после трансфекции гибридов, содержащих ДНК-связывающий домен и домен активации GAL4, в дрожжевые клетки SFY526, которые обладают лучшей LACZ индуцибельностью активатором транскрипции GAL4, чем клетки-хозяева дрожжевого штамма HF-7.

Результаты осуществления вышеуказанных ко-трансфекций представлены ниже в Таблице 1, из которой видно, что обнаруженные белки способны связываться с р551С или р751С, а именно, белки, обозначенные 55.11, которые связываются с р551С; и 75.3 и 75.16, которые связываются с р751С. Все указанные р551С - и р751С-связывающие белки являются аутентичными белками человека, кодируемыми кДНК-последовательностями, происходящими из кДНК-библиотеки клеток HeLa, и считыми с последовательностью домена активации GAL4 в плазмиде рGAD GH в вышеописанной дрожжевой двухгибридной системе анализа.

Интересно отметить, что было также обнаружено, что сами фрагменты р551С, а именно, белки, обозначенные 55.1 и 55.3, способны связываться с р551С. Этот факт обсуждается также ниже, в Примере 2.

Таблица 1

Суммарные характеристики некоторых кДНК-клонов (см. также Пример 3), выделенных методом с использованием двухгибридной системы

Гибрид, содержащий ДНК-связывающий домен	Гибрид, содержащий домен активации	Окраска колоний	Lac Z –активность в анализе с использованием жидкой культуры
рGBT9-1С55	-	белая	0,00
рGBT9-1С55	55,1	голубая	0,65
рGBT9-1С55	55,3	голубая	0,04
-	55,1	белая	0,00
-	55,3	белая	0,00
рACT-ламин	55,1	белая	0,00
рACT-ламин	55,3	белая	0,00
рGBT9	55,1	белая	0,00
рGBT9	55,3	белая	0,00
рGBT9-1С55	55,11	голубая	не опр.
-	55,11	белая	не опр.
рACT-ламин	55,11	белая	не опр.
рGBT9	55,11	белая	не опр.
рGBT9-1С75	75,3	голубая	не опр.
рGBT9-1С75	-	белая	не опр.
-	75,3	белая	не опр.
рACT-ламин	75,3	белая	не опр.
рGBT9	75,3	белая	не опр.
рGBT9-1С75	75,16	голубая	не опр.
-	75,16	белая	не опр.
рACT-ламин	75,16	белая	не опр.
рGBT9	75,16	белая	не опр.

В вышеприведенной Таблице, представлены следующие плазмиды и гибрид, кодирующий ДНК-связывающий домен GAL4 и домен активации GAL4:

Гибриды, содержащие ДНК-связывающий домен:

pGBT9-1C55: полноразмерный внутриклеточный домен p55-TNF-R (p551C)

pACT-ламин: нерелевантный белок - ламин

pGBT9: один вектор

pGBT9-1C75: полноразмерный внутриклеточный домен p75-TNF-R (p751C)

Гибрид, содержащий домен активации:

55.1 и 55.3 соответствуют фрагментам внутриклеточного домена P55-TNF-R.

55.11: новый белок, ассоциирующийся с p55-TNF-R

75.3 и 75.16: новые белки, ассоциирующиеся с p75-TNF-R

Вышеуказанные клонированные кДНК, кодирующие новые p551C и p751C-связывающие белки, а именно 55.11, 75.3 и 75.16, были затем секвенированы с использованием стандартных методов секвенирования ДНК. Частичные последовательности всех указанных последовательностей, кодирующих белок, показаны на Рис.1а-с, где на Рис.1(а) показана последовательность кДНК, кодирующая белок 55.11; на Рис.1(б) показана частичная кДНК-последовательность, кодирующая белок 75.3; а на Рис.1(с) показана частичная последовательность кДНК, кодирующая белок 75.16. На Рис.1(д) показана аминокислотная последовательность белка 55.11, выведенная из нуклеотидной последовательности, изображенной на Рис.1(а).

Однако, при этом, следует отметить, что о последовательности кДНК, кодирующей белок 55.11, также сообщалось [Khan. и др. (1992)] в их исследованиях, посвященных кДНК-последовательностям головного мозга человека, и направленных на разработку нового быстрого и точного способа секвенирования и физического и генетического картирования кДНК головного мозга человека. Однако, Khan и др. ничего не сообщают о функции или о каких-либо других свойствах белка, кодируемого 55.11-кДНК-последовательностью, поскольку такой функциональный и другие анализы не были целью исследований Khan. и его сотрудников.

Анализ и характеристика белка 55.11

а) Общая методика и материалы

i) Клонирование кДНК 55.11

После анализа (например, Нозерн-анализа, см. ниже) кДНК белка 55.11 было выявлено, что вышеуказанная кДНК белка 55.11, клонированная двухгибридным методом скрининга, представляет собой лишь частичную кДНК белка 55.11, имеющую нуклеотиды 925-2863 (см. Рис.1(а)), которые кодируют аминокислоты 309-900 (см. Рис.1(д)). Остальная часть 55.11-кДНК (нуклеотиды 1-924 (Рис.1(а)), которые кодируют аминокислоты 1-308 (Рис.1(д)) была получена стандартными методами, а именно, путем PCR-клонирования из кДНК-библиотеки фетальной печени человека (более подробно см. ниже). Полную нуклеотидную последовательность 55.11 (Рис.(а)) определяли в обоих направлениях методом дидезокситерминации цепи.

ii) Двухгибридный метод анализа на экспрессию β-галактозидазы

Тест на экспрессию β-галактозидазы осуществляли, как описано выше, за исключением того, что вместо вектора pGAD-GH, содержащего домен активации GAL4, использовали вектор pVP16, который содержал домен активации VP16. Нумерация остатков в белках, кодируемых кДНК-вставками, была такой же, как в банке данных pGAD- GH. Делеционные мутации продуцировали с помощью PCR, а точечные мутации продуцировали с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза [Kunkel, 1994].

iii) Нозерн-анализ

Полную РНК выделяли с использованием TR1 REAGENT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Oh., U.S.A.) затем денатурировали в формальдегид/формамидном буфере, подвергали электрофорезу на агарозном/формальдегидном геле, и блокировали на мембрану Gene SCREEN Plus (Duhont, Wilmington, De., USA) в 10х SS PE-буфере с использованием стандартной техники. Блоты гибридизовали с частичной кДНК белка 55.11 (см. выше, нуклеотиды 925-2863), подвергали радиоактивному мечению с использованием набора для рандомизированного праймирования (boehringer Mannheim biochemica, Mannheim, Germany), и промывали в жестких условиях. Авторадиографию осуществляли в течение 1 недели.

iv) Экспрессия кДНК белка 55.11 в клетках HeLa и связывание белка 55.11 с белками, представляющими собой гибрид глутатион- S-трансферазы с p55-1C

Получали гибриды глутатион-S-трансферазы (GST) с p55-1C (GST-p551C) и с p551C, усеченным ниже аминокислоты 345 (GST-p551C345), и адсорбировали на глутатион-агарозные шарики, как описано ниже в Примере 2 [см. также Smith & Corcoran, 1994; Frangioni & Neel, 1993]. кДНК белка 55.11 (нуклеотиды 1-2863, т.е., кДНК полноразмерного 55.11), FLAG-55.11 и люциферазы экспрессировали в клетках HeLa. FLAG-55.11 представляют собой фрагмент белка 55.11, простирающийся между аминокислотными остатками 309 и 900 (частичная кДНК-последовательность белка 55.11 (нуклеотиды 925-2863), первоначально клонированная методом двухгибридного скрининга), и N-сшитый с октапептидом FLAG (Fastman Kodak, New Haven, Ct. USA). Экспрессию гибридных белков осуществляли с использованием тетрациклин-регулируемого экспрессирующего вектора (HtTA-1) в клоне клеток HeLa, который экспрессирует тетрациклин-регулируемый транскриптор (см. ниже, Пример 2, и [Gossen & Bujard, 1992]). Метаболическое мечение экспрессированных белков с помощью [³⁵S] Met и [³⁵S] Cys (Dupont, Wilmington, De USA; Amersham, bucking hamshire, England), лизис клеток HeLa, иммунопреципитацию, и связывание меченных белков с GST-гибридными белками осуществляли как описано ниже (Пример 2), за исключением того, что в буфере для лизиса клеток вместо 0,1% Nonidet P-40 присутствовал 0,5% Nonidet P-40. Иммунопреципитацию 55.11 и FLAG-55.11 проводили с использованием кроличьей антисыворотки (разведенной 1:500), продуцированной против GST-гибридного белка, содержащего область 55.11, простирающуюся между аминокислотами 309 и 900, и мышинного

моноклонального антитела против октапептида FLAG (M2; Eastman Kodak 5мкг/мл клеточного лизата).

о) Связывание белка 55.11 с p55-1C в трансформированных дрожжах

Это исследование было предпринято для выявления природы связывания между 55.11 и p551C, а в частности, для выявления областей этих белков, участвующих в связывании. Для этого была применена двухгибридная методика, описанная выше, где различные полноразмерные и делеционные мутанты p551C (см. также ниже, Пример 2) в конструкциях "ДНК-связывающего домена" были использованы в качестве "приманки" для связывания с "добычей", являющейся неполным белком 55.11, кодируемым в конструкциях, в которых эта неполная 55.11-последовательность (остатки 309-900, первоначально выделенные) была присоединена к "домену активации" в векторах GAL4AD и VP16AD. Кроме того, были сконструированы различные делеционные мутанты 55.11, которые были лигированы с "доменом активации" в векторе GAL4AD (например, мутанты 55.11, имеющие лишь остатки 309-680 и 457-900). Связывание различных конструкций со "связывающим доменом" с различными конструкциями с "доменом активации" исследовали в трансфецированных дрожжевых клетках SFY52б. Связывание оценивали с помощью анализа на экспрессию β-галактозидазы, проведенного двухгибридным методом с использованием мембранного фильтра. Нерелевантные белки SNF1 и SNF4 служили в качестве контроля для конструкций со "связывающим доменом" и "доменом активации", соответственно; "пустые" векторы (т.е., не содержащие Ga14 (pGAD-CH) и VP16 (PVP16) служили в качестве негативного контроля для конструкций с "доменом активации"; а "пустой" Ga14-вектор (pGBT9) служил в качестве негативного контроля для конструкций со "связывающим доменом". Результаты анализа представлены ниже в Таблице 2, где символы "+++" и "++" указывают на развитие яркой окраски через 20-60 минут после начала анализа, соответственно (положительные результаты связывания); а символ "-" означает отсутствие окраски через 24 часа после начала анализа (отрицательные результаты). Пустое пространство в Таблице 2 означает, что анализ на связывание не проводили).

Table 2 Таблица 2
Binding of the 55.11 protein to p55-1C
within transformed yeasts

Связывание белка 55.11 с p55-1C в трансформированных дрожжевых клетках

Гибрид с ДНК-связывающим доменом DNA-BINDING - DOMAIN HYBRID		Гибрид с доменом активации ACTIVATION-DOMAIN HYBRID						
		- гибриды					-гибриды	
		Gal4 AD HYBRIDS					VP16 AD HYBRIDS	
		55.11					55.11	
		309-900	309-680	457-900	SNF4	PGAD-GH	309-900	PVP16
	p55-IC (full)	++	-	-	-	-	-	-
	206-345	++					+++	
	206-328	+++					+++	
	206-308	+++					+++	
	243-328	+++						
	266-426	-						
	328-426	-						
	SNF1	-			+			
pGBT9	-					-		

Из результатов, представленных в вышеприведенной Таблице 2, можно сделать вывод, что 55.11 связывается с p55-1C в сайте, который не относится к "домену смерти" (остатки 328-426) p55-1C.

Белок 55.11 связывался с укороченным p55-1C, из которого был делетирован "домен смерти" (конструкция 206-328 в Таблице 2), более эффективно, чем с полным p55-1C. Кроме того, этот белок даже связывался с более укороченным по С-концу p55-1C (конструкция 206-308), а также с конструкцией, из которой были удалены "домен смерти" и мембрано-проксимальная часть p55-10 (конструкция 243-328). Однако, белок 55.11 не связывался с конструкцией, которая была укорочена по N-концу до аминокислоты 266 (Таблица 2). Эти данные свидетельствуют о том, что сайт связывания для 55.11 расположен в области, простирающейся между остатками 243 и 308 p55-1C, и что N-конец этого сайта связывания находится между остатками 243 и 266.

Перенос кДНК для белка 55.11 из первоначальной клонированной конструкции "добычи", которая содержала домен активации GAL4, в конструкцию "добычи", содержащую домен активации P16, не снижал эффективность связывания белка 55.11 с p55-1C (Таблица 2). Таким образом, структура (или структуры), участвующие в этом связывании, очевидно, находится в молекуле 55.11 и не включают в себя сайт слияния 55.11 с доменом активации.

Однако, связывания 55.11 с p55-1C не происходит даже при ограниченном усечении белка 55.11 в его С (55.11-конструкция 309-680)-конце или N-конце (55.11-конструкция 457-900). (Остаток 309 является первым

остатком в белке 55.11, кодируемым частичным кДНК-клоном, первоначально выделенным при двухгибридном скрининге).

Наблюдаемое связывание между 55.11 и p55-1C является, очевидно, специфическим, поскольку 55.11 не связывался с другими белками, включая три рецептора семейства рецепторов TNF/NGF (p75-R, FAS/APO1 и CD40), и с такими белками, как ламин и циклин D (данные не приводятся). При этом, следует отметить, что из других проанализированных TNF/NGF-рецепторов белков были также протестированы те их части, которые содержали внутриклеточные домены: FAS-R человека (остатки 175-319), CD40 (остатки 216-277) и p75-TNF-R (остатки 287-461), и ни один из них не связывался с 55.11 (данные не приводятся).

с) Нозерн-анализ РНК от нескольких клеточных линий с использованием 55.11-кДНК в качестве зонда, и клонирование полноразмерной 55.11-кДНК.

Исследуемыми клеточными линиями были клетки HeLa, CEM, Jurkat и HepG2, происходящие от эпителиальной карциномы человека, острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза, острого Т-клеточного лейкоза, и гепатоцеллюлярной карциномы, соответственно. Сначала выделенную 55.11-кДНК (нуклеотиды 925-2863) использовали в качестве зонда. Образцы состояли из 10мкг РНК на дорожку. Результаты Нозерн-анализа показаны на Рис.2, на котором воспроизведен Нозерн-блот.

Таким образом, из Рис.2 видно, что в результате Нозерн-анализа, проведенном для нескольких клеточных линий с использованием 55.11-кДНК в качестве зонда, был выявлен один гибридизирующий транскрипт, примерно 3кб, который был крупнее чем кДНК (2кб) от первоначально выделенной 55.11-кДНК. Используя олигонуклеотидные праймеры, которые соответствовали последовательности 55.11, мы клонировали, с помощью РСД, 5'-простирающуюся последовательность, длина которой составляла 1кб. Сумма длин этого 5'-простирающегося участка и первоначально клонированной кДНК-последовательности равна приблизительно длине этого 55.11-транскрипта. 3кб-кДНК, которая включала в себя обе эти части, эффективно экспрессировалась в клетках HeLa (см. ниже) с образованием белка длиной примерно 84кДа, что позволяет предположить, что эта 3кб-кДНК содержит сайт инициации трансляции.

d) *In vitro* - связывание белка 55.11 с GST-гибридными белками, содержащими области p55-1C

Для того чтобы убедиться в том, что 55.11 действительно могут связываться с p55-1C, и что дрожжевые белки не участвуют в этом связывании, было исследовано *in vitro* - взаимодействие GST-p55-1C-гибридных белков, продуцированных бактериями, с белком, кодируемым 3кб-55.11-кДНК (полноразмерным 55.11), и продуцированным трансфецированными клетками HeLa. В этом исследовании, кДНК для полноразмерных белков 55.11, FLAG-55.11 (остатки 309-900 белка 55.11, кодируемого первоначально клонированной частичной кДНК, и слитого, в своем N-конце, с октапептидом FLAG), и люциферазы (контроль) экспрессировали в трансфецированных клетках HeLa, и метаболически метили [³⁵S] Met и [³⁵S] Cys. С GST были гибридизированы следующие белки: полноразмерный p55-1C (GST-p55-1C) и p55-1C, усеченный по C-концу до аминокислоты 345 (GST-p55-1C345) в целях удаления "домена смерти" (см. Таблицу 2). Один GST служил в качестве контроля. Лизаты трансфецированных клеток подвергали иммунопреципитации с антителами против белка 55.11 в том случае, если для связывания с GST-гибридными белками использовали полноразмерный 55.11; или с антителами против октапептида FLAG в том случае, если для связывания с GST-гибридными белками использовали FLAG-55.11-гибридный продукт. Белки анализировали с помощью электрофореза на полиакриламидном геле с ДСН (ДСН-ПААГ: 10% акриламид), а затем подвергали автордиографии.

На Рис.3А и 3В представлены автордиограммы вышеуказанных ДСН-ПААГ-гелей, где на Рис.3А проиллюстрировано связывание полноразмерного белка 55.11 (55.11-full) с различными GST-гибридными белками; а на Рис.3В проиллюстрировано связывание Flag-55.11-гибридного продукта с различными GST-гибридными белками. На Рис.3А, на самой крайней дорожке справа, показан контрольный иммунопреципитат лизатов клеток, трансфецированных только одним полноразмерным 55.11 и иммунопреципитированных антителами против 55.11 (антитела α 55.11). На Рис.3В, на самой крайней дорожке справа показан контрольный преципитат лизатов клеток, трансфецированных лишь одним FLAG-55.11 и иммунопреципитированных антителами против FLAG (антитела α FLAG).

Таким образом, из Рис.3А и 3В видно, что белок, кодируемый кДНК полноразмерного 55.11, может экспрессироваться в клетках HeLa и связываться с гибридными белками, содержащими полный p55-1C (GST-p551C) или усеченный p55-1C, в котором отсутствует большая часть "домена смерти" (GST-p551C345) (Рис.3А). Полноразмерный белок 55.11 не связывался с одним GST (контроль). Аналогичным образом, белок, экспрессированный в клетках HeLa и кодируемый первоначально клонированной частичной кДНК для 55.11, гибридизированного с октапептидом FLAG (FLAG-55.11), связывался *in vitro* с GST-p551C и GST-p551C345, но не связывался с GST (Рис.3В). Приведенные выше результаты являются также дополнительным доказательством того (см. выше, п.(b)), что 55.11 связывается с участком p551C, расположенным выше "домена смерти", т.е., в области p55-1C, которая расположена ближе к трансмембранному домену.

Кроме того, вышеописанное исследование также продемонстрировало, что в соответствии с настоящим изобретением могут быть успешно продуцированы антитела против 55.11 (Рис.3А).

е) Сравнение выведенной аминокислотной последовательности белка 55.11 человека с последовательностями родственных белков, присутствующих в низших организмах, и особенности последовательности белка 55.11

Как упоминалось выше, в соответствии с настоящим изобретением была клонирована и секвенирована кДНК для полноразмерного белка 55.1 (см. нуклеотидную последовательность на Рис.1(а)), и из этой кДНК-последовательности была выведена полноразмерная аминокислотная последовательность 55.11 (см., аминокислотную последовательность на Рис.1(д)). Исследования последовательностей, имеющихся в банке данных (GenBank™/EMBL DataBank), показали, что части последовательности 55.11-кДНК человека [рег. №№T03659, 19559 и F0128] и их мышинный гомолог [рег. №№X80422 и Z31147] были уже определены в процессе производного секвенирования кДНК-библиотек. кДНК-последовательность (входящий №18247), которая кодирует белок человека в 596 аминокислот, присутствующий в культурах клеток гепатомы HC10

человека, аналогична последовательности, кодирующей белок 55.11. Однако, в белке этой гепатомы отсутствует N-концевая часть (аминокислоты 1-297), соответствующая таковой в 55.11, и кроме того, этот белок отличается от 55.11 в областях, соответствующих остаткам 297-377 и остаткам 648-668 в 55.11. Исследования последовательностей, имеющихся в банке данных, также выявили, что белки, присутствующие в *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи), *Arabidopsis thaliana* (растение Ресушка Таля) и *Caenorhabditis elegans* (гельминты). Таким образом, очевидно, что 55.11 осуществляет эволюционно консервативную функцию. В дрожжах присутствуют два известных белка (открытая рамка считывания УНРО27с и SEN3), ДНК-последовательности которых подобны ДНК-последовательности 55.11. Размер обеих этих последовательностей также близок размеру 55.11. Последовательность УНРО27с стала известной лишь благодаря секвенированию геномного клона, тогда, как последовательность SEN3 была клонирована как кДНК. Сайты в 55.11, которые аналогичны сайтам в SEN3, коррелируют по своей идентичности с сайтами в УНРО27с, хотя, очевидно, большая схожесть наблюдается между 55.11 и УНРО27с, чем между 55.11 и SEN3. Имеющиеся данные (хотя только частичные) о ДНК-последовательностях для белков *Arabidopsis thaliana* и *Caenorhabditis elegans* ясно показывают, что эти белки схожи с 55.11, как и белок УНРО27с дрожжей. Из этих четырех белков, природа которых была выявлена к настоящему времени, лишь один белок, а именно, белок дрожжей SEN3, имеет ограниченную гомологию с 55.11. SEN3 был идентифицирован как дрожжевой эквивалент субъединицы p112 активатора протеасомы 20S [протеолитическая центральная часть (кор) протеасомы 26S Rechsteiner и др., 1993; DeMartino и др. 1994] [M.P. Cullerton и M. Hockstrasser, личное сообщение].

На Рис.4 схематически проиллюстрировано сравнение выведенной аминокислотной последовательности 55.11 человека с последовательностями вышеупомянутых родственных белков, присутствующих в низших организмах. Последовательностями, сравниваемыми на Рис.4, являются последовательности аминокислот, предсказанных для: 55.11-кДНК (см. Рис.1(d)); открытая рамка считывания (УНРО27с) в космиде, происходящей из 8-ой хромосомы *Saccharomyces cerevisiae* (нуклеотиды 21253-24234, номер допуска 10399); кДНК белка *Saccharomyces cerevisiae* (номер допуска 06321); частичная кДНК белка растения *Arabidopsis thaliana* (ресушка Таля) (номер допуска T21500), и частичная кДНК белка нематоды *Caenorhabditis elegans* (номер допуска 27396). На Рис.4, последовательность "KEKE" в 55.11 отмечена сплошной линией, а последовательность AYAGS(x)₈ LL отмечена пунктирной линией. Сравнительный анализ первичных структур последовательностей проводили с использованием программ PILEUP и PRETTYBOX пакета GCG. "Бреши", введенные для максимизации сравнения, обозначены точками.

Что касается отличительных признаков различных последовательностей, или мотивов, присутствующих в последовательности 55.11 человека, были сделаны следующие наблюдения. В белке, кодированном в 55.11-последовательностью, за исключением повторяющейся последовательности "KEKE", которая между Lys 614 и Glu 632 (подчеркнута на Рис.4), "мотивов" консервативной аминокислотной последовательности обнаружено не было. Такие последовательности "KEKE", которые присутствуют во многих белках, включая протеасомные субъединицы и белки - "наставники" (chaperonins) которые могут стимулировать ассоциацию белковых комплексов [Realini и др., 1994]. Последовательность AYAGS(x)₈ LL 11 появляется в последовательности белка 55.11 два раза (в сайтах 479 и 590, см. Рис.4), однако, какая-либо функциональная роль этой последовательности не была установлена.

f) Отличительные признаки последовательности области p55-1C, участвующей в связывании с белком 55.11

Как описано выше (см. пп (b) и (d)), белок 55.11 связывается с областью p55-1C, расположенной между остатками 243 и 308 (N-конец этого связывающего сайта находится между остатками 243 и 266), и находящейся выше "домена смерти" и ближе к трансмембранному домену p55-TNF-R. Эта область в p55-1C, с которой связывается белок 55.11, имеет высокое содержание пролиновых, сериновых и треониновых остатков. Однако, эта область не содержит обогащенных пролиновых "мотивов" RPM1 и RPM2, присутствующих в некоторых других цитокиновых рецепторах [O' Neal Yulee, 1993]. В области, которая простирается между остатками 243 и 266, и делеция которой приводит к отсутствию связывания p55-R, с 55.11 (см. выше, пп (a) и (b), и Таблица 2), за двумя сериновыми остатками и двумя треониновыми остатками следуют пролиновые остатки, что делает их потенциальными сайтами для фосфорилирования MAP-киназой, CDC2, и другими пролиннезависимыми киназами [Seeger и Krebs, 1995], фосфорилирование в этом сайте рецепторов может влиять на их связывание с белком 55.11.

Принимая во внимание вышеуказанные данные, относящиеся к белку 55.11 и его связыванию с p55-1C, можно сделать вывод, что в соответствии с настоящим изобретением обнаружен новый белок, который связывается с определенной областью, расположенной выше "домена смерти" p55-1C. Это связывание должно оказывать влияние на TNF-опосредованные активности, за исключением индуцирования гибели клеток. Как было показано ранее, область, с которой связывается 55.11, участвует в индуцировании синтазы окиси азота [Tartaglia и др., 1993], и, очевидно, участвует в активации нейтральной сфингомиелиназы фактором некроза опухоли [Wiegmann и др., 1994]. Таким образом, возможно, что ассоциация (связывание) белка 55.11 с внутриклеточным доменом p55-TAF-R, (p551C) оказывает влияние или участвует в (i) передаче сигнала для указанных выше или других TNF-эффектов; (ii) укладке или процессинге белка (как предполагается исходя из схожести 55.11 с субъединицей протеасомы 26S); или (iii) регуляции активности или экспрессии P55-TNF-R.

Пример 2

Способность к самоассоциации внутриклеточного домена p55-TNF-рецептора (p551C), его способность вызывать гибель клеток, и его другие отличительные признаки и функции; и внутриклеточный домен родственных рецепторов FAS/APO1.

Как указывалось выше, в Примере 1, было обнаружено, что внутриклеточный домен p55-TNF (p551C) способен связываться с самим собой, и кроме того, было установлено, что фрагменты p551C, а именно, белки 55.1 и 55.3, также способны связываться с p551C.

Известно, что связывание TNF с p55-TNF-R приводит к цитотоксическому действию на клетки, несущие этот рецептор. Кроме того, антитела против внеклеточного домена этого рецептора могут сами стимулировать это действие в соответствии с эффективностью перекрестного сшивания рецептора этими антителами.

Кроме того, мутационные исследования [Tartaglia и др., 1993; Brackebusch и др., 1992] показали, что функция p55-R зависит от целостности его внутриклеточного домена. Поэтому, есть основания предположить, что инициация передачи сигнала для цитотоксического эффекта TNF происходит в результате ассоциации двух или нескольких внеклеточных доменов p55-R (p55-1C), вызываемой агрегации рецепторов. Результаты, полученные в соответствии с настоящим изобретением, подтверждают этот вывод, и свидетельствуют о том, что экспрессия внутриклеточного домена p55-R в клетках без трансмембранного или внутриклеточного домена, стимулирует гибель этих клеток. Было показано, что такие свободные внутриклеточные домены p55-R способны к самоассоциации, что, очевидно, является причиной их способности функционировать независимо от TNF. Тот факт, что передача сигнала полноразмерным p55-R зависит от стимуляции TNF, отражает, как предполагается, активность трансмембранного или внеклеточного домена рецептора, которая способствует снижению или предупреждению этой самоассоциации.

Способность внутриклеточного домена p55-R (p55-1C) к самоассоциации была обнаружена случайно при попытке клонировать эффекторный белок, который взаимодействует с этим рецептором (см. выше, Пример 1). Для этих целей был применен вышеописанный "двухгибридный" метод. При этом было обнаружено, что помимо нового белка, 55.11 ассоциируется (связывается) с p55-1C, и было также обнаружено, что три других клонированных кДНК клеток HeLa содержат кДНК-последовательности, кодирующие части внутриклеточного домена p55-R, что означает, что p55-1C обладает способностью к самоассоциации. Два этих клон были идентичными, и содержали вставку, которая кодирует аминокислоты 328-426 (эти клоны были обозначены клоном 55.1, кодирующим белковый фрагмент 55.1 p551C). Третий клон содержал более длинную вставку, кодирующую аминокислоты 277-426 (этот клон был обозначен клоном 55.3, кодирующим белковый фрагмент 55.3 p551C).

Кроме того, мы проводили оценку *in vitro* - взаимодействия между двумя продуцированными в бактериях химерами p551C, одна из которых была гибридизирована с мальтозосвязывающим белком (МБР), а другая была гибридизирована с глутатион- S-трансферазой (GST). Эти химеры были сконструированы, клонированы и экспрессированы стандартными методами. После их экспрессии, проводили оценку самоассоциации внутриклеточного домена p55-R, (p551C) путем анализа взаимодействия вышеуказанных бактериально продуцированных химерных белков GST-1C55 (Mr=51кДа) и MBP-1C55 (Mr=67кДа) друг с другом. Для этого, равные количества химеры GST-1C55 (образцы дорожек 1-4 на Рис.5) или одной GST (образцы дорожек 5-8 на Рис.5) иммобилизовывали на глутатион-агарозных шариках (Sigma), а затем инкубировали с тем же самым количеством MBP-1C55-гибридного белка в одном из следующих буферных растворов:

- i) буфер 1 (20мМ Трис-HCl, pH7,5, 100мМ KCl, 2мМ CaCl₂, 2мМ MgCl₂, 5мМ DTT, 0,2% Тритон X100, 0,5мМ PMSF, 5% Глицерин). Этот буфер был использован для образцов дорожек 1 и 5 на Рис.5.
- ii) буфер 1, содержащий 5мМ EDTA вместо MgCl₂. Этот буфер использовали для образцов дорожек 2 и 6 на Рис.5.
- iii) буфер 1, содержащий 250мМ вместо 100мМ KCl. Этот буфер использовали для образцов дорожек 3 и 7 на Рис.5.
- iv) буфер 1, содержащий 400мМ вместо 100мМ KCl. Этот буфер использовали для образцов дорожек 4 и 8 на Рис.5.

После инкубирования с вращением в течение 2 часов при 4°C, шарики промывали этими же буферами, а затем кипятили в ДСН-ПААГ-буфере с последующим электрофорезом в ПААГ. Белки на геле подвергали Вестерн-блотированию на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем окрашивали поликлональной антисывороткой против МБР. Указанный окрашенный Вестерн-блот изображен на Рис.5 (образцы на дорожках 1-8, описанные выше).

Из Рис.5 видно, что химера p551C-GST связывается с химерой p551C-GST (дорожки 1-4) независимо от присутствия двухвалентных катионов, и даже при достаточно высокой концентрации соли (0,4М KCl). Отсюда можно сделать вывод, что p551C обладает способностью к авидной самоассоциации.

Для оценки функциональной роли этой способности p55-1C к самоассоциации, мы предприняли попытку экспрессировать p55-1C в цитоплазме клеток, являющихся восприимчивыми к цитотоксическому действию TNF. Принимая во внимание тот факт, что p55-1C, в свою очередь, может быть цитотоксическим, мы выбрали индуцибельный тип экспрессии, использовав для этого недавно разработанную строго регулируемую тетрациклин-контролируемую экспрессирующую систему млекопитающего [Gossen и Boujard, 1992]. Экспрессия p55-1C приводила к массовой гибели клеток (Рис.6, правая панель). У погибающих клеток наблюдается разрыхление клеточной поверхности, как это происходит при TNF-киллинге клеток. Трансфекция p55-1C-конструкции в клетки в присутствии тетрациклина, который заметно снижает уровень экспрессии pHD10-3-регулируемых конструкций вплоть до 10⁵-кратного снижения, все-таки приводит к гибели некоторых клеток, хотя и в значительно меньшей степени, чем это наблюдается в отсутствие тетрациклина (Рис.6, левая панель). В противоположность этому, клетки, трансфецированные контрольной конструкцией, содержащей кДНК люциферазы, не обнаруживали каких-либо признаков гибели (результаты не приводятся).

Способность p55-1C стимулировать гибель клеток, при его экспрессии без трансмембранного или внеклеточного доменов рецептора, лишней раз свидетельствует о том, что этот домен участвует в передаче сигнала. Кроме того, этот факт указывает на то, что ни одна из других частей рецептора не играет непосредственной роли в такой передаче сигнала. Исследования влияния мутаций, включая мутации, рассматриваемые в настоящем изобретении, на функцию p55-1C показали, что для этой функции наиболее важной областью является область, простирающаяся между аминокислотными остатками 326 и 407. Эта область обнаруживает заметное сходство с последовательностями внутриклеточных доменов двух других рецепторов, являющихся эволюционно родственными рецептору p55-TNF, а именно, FAS-рецептора [Itoh и др., 1991; Oehm и др., 1992], который также способен передавать цитотоксический сигнал; и CD40 - рецептора

(Stamenkovic и др., 1989), который способствует усилению роста клеток; поэтому, последовательность этой области, очевидно, содержит консервативный мотив, который играет одну из главных ролей в передаче сигнала. Поскольку не имеется похожих известных "мотивов", характерных для ферментативной активности, то, очевидно, эта область передает сигнал опосредованным образом, т.е., возможно, она служит в качестве "стыковочно-приемного" сайта для передающих сигнал ферментов или для белков, передающих стимулирующие сигналы для этих ферментов. Все p55-1C, FAS-рецептор и CD 40 могут быть стимулированы антителами против их внеклеточного домена. Эта стимуляция должна, как было показано, коррелировать со способностью антител к перекрестному связыванию с рецепторами. Поэтому, очевидно, что передача сигнала инициируется в результате взаимодействия двух или более внутриклеточных доменов, индуцируемого посредством агрегации внеклеточных доменов. Участие в таком взаимодействии рецепторов с последующей передачей сигнала было также установлено путем исследования [Brackebusch и др., 1992], показавшего, что экспрессия рецепторов, лишенных своих функций путем мутации их внутриклеточного домена, имела "доминирующее негативное" действие на функцию ко-экспрессированных нормальных рецепторов. Агрегация p55-R в ответ на действие TNF позволяет предположить, что она происходит пассивно, и обусловлена лишь тем фактом, что каждая из молекул TNF, которая является гомотримером, может связываться с двумя или с тремя рецепторными молекулами. Однако, данные, полученные в результате осуществления настоящего изобретения, дают основания предположить, что этот процесс протекает несколько по другому типу.

Тенденция p55-1C к самоассоциации свидетельствует о том, что этот домен играет активную роль в своей индуцированной агрегации. Кроме того, эта активность p55-1C является, очевидно, достаточной для инициации передачи сигнала, поскольку, при его экспрессии независимо от остальной части рецепторной молекулы, он может стимулировать гибель клетки в отсутствие TNF или любых других внешних стимулов. Тем не менее, при его экспрессии в качестве полноразмерного рецептора, этот p55-TNF-R не передает сигнал, если он не стимулирован TNF. Поэтому, можно сделать вывод, что при активации p55-TNF-рецептора, TNF, фактически преодолевает некоторые ингибирующие механизмы, предупреждающие спонтанную ассоциацию внутриклеточных доменов, и это ингибирование обусловлено связыванием p55-1C с остальной частью рецепторной молекулы. Ингибирование может быть обусловлено ориентацией, придаваемой внутриклеточному домену трансмембранным и внеклеточным доменом; связыванием некоторых других белков с рецептором; или, что вероятнее всего, ограничением количества рецепторов, которые могут находиться в плазматической мембране. Разумеется, что этот механизм регуляции должен быть достаточно эффективным, так как, по некоторым оценкам, связывание даже только одной TNF-молекулы с клеткой является достаточным для стимуляции ее гибели.

Спонтанная передача сигналов, независимо от лиганда, может привести к значительному нарушению процесса, регулируемого этим рецептором. Самым известным примером этого служит прекращение регуляции рецепторов фактора роста. Так, например, в неконтролируемом росте опухолевых клеток важную роль играют мутации, в результате которых инициация передачи сигнала становится спонтанной, например, мутации, вызывающие спонтанную агрегацию рецепторов. Хорошо известно, что TNF-эффекты, при их избыточном индуцировании играют важную роль в патологии многих заболеваний. Способность свободных внутриклеточных доменов (p551C) p55-TNF-рецептора к независимой от TNF передаче сигнала может вносить свой вклад в такие патологические явления. Вполне возможно, например, что цитопатическое действие некоторых вирусов и других патогенов обусловлено не прямой их цитотоксической активностью, а протеолитическим расщеплением внутриклеточного домена p55-TNF-рецептора, приводящим к TNF-подобному цитотоксическому эффекту.

Для более точного выявления области (или областей) в p551C, ответственной за его способность к самоассоциации, а поэтому за его лиганд-независимую цитотоксичность, а также для определения, имеются ли в других родственных членах семейства TNF/NGF-рецепторов (например, FAS-R) внутриклеточные домены со способностью к самоассоциации и к лиганд-независимому действию, были проведены тщательные исследования, описанные ниже.

а) Общие методы и материалы

i) Двухгибридный скрининг и двухгибридный тест на экспрессию β -галактозидазу

кДНК-вставки, кодирующие p55-1C и его делеционные мутанты, FAS-1C и различные другие белки (см. Таблицу 3) клонировали с помощью PCR, из полноразмерных кДНК, клонированных ранее в нашей лаборатории, или из коммерчески приобретенных кДНК-библиотек. Экспрессию β -галактозидазы в дрожжах [репортерный штамм FY526; Bartel и др., 1993], трансформированных указанными кДНК в векторах pGBT-9 и pGAD-CN (конструкции с ДНК-связывающим доменом (DBD) и доменом активации (AD), соответственно) оценивали с помощью теста в растворе [Guarente, 1983]; а также проводили анализ на фильтрах для качественной оценки тех же самых результатов (не показано). Двухгибридный скрининг [Fields и Song 1989] закупленной GAL4-A1-меченой кДНК-библиотеки клеток HeLa (Clontech, Palo Alto, Ca., U.S.A.) для белков, которые связываются с внутриклеточным доменом p55-R, (p55-1C) осуществляли с использованием репортерного дрожжевого штамма HF7с в соответствии с рекомендациями производителя. Положительность выделенных клонов оценивали по (а) прототрофии трансформированных дрожжей в отношении гистидина при их культивировании в присутствии 5мМ 3-аминотриазола; (b) экспрессии β -галактозидазы; и с) тесту на специфичность (взаимодействие с SNF4 и ламинном, слитым с GAL4 DBD).

ii) Самоассоциация *in vitro* p55-1C-гибридных белков, продуцированных в бактериях

Глутатион- S-трансферазу (GST) и гибридный белок "глутатион-S-трансфераза - p55-1C (GST-p55-1C) продуцировали как описано в литературе [Frangioni и Neel, 1993; Ausubel и др., 1994]. Мальтозосвязывающие (МБР) гибридные белки получали с использованием вектора pMALcR1 (New England Biolabs) и очищали на колонке с амилозной смолой. Взаимодействие МБPP- и GST-гибридных белков исследовали путем последовательного инкубирования глутатион-агарозных шариков с GST- и МБPP-гибридными белками (5мкг белка/20мкл шариков; первое инкубирование проводили в течение 15 минут, а второе в течение 2 часов, оба

при 4°C). Инкубирование с МБР-гибридными белками осуществляли в буферном растворе, содержащем 20мМ Трис-НCl, pH7,5, 100мМ KCl, 2мМ CaCl₂, 2мМ MgCl₂, 5мМ дитиотреитола, 0,2% Тритона X100, 0,5мМ фенол-метил-сульфонилфторид и 5% (по объему) глицерина; если это было необходимо, в том же самом буфере, содержащем 0,4М KCl, или 5мМ EDTA вместо MgCl₂. Ассоциирование МБР-гибридных белков оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН (10% акриламида) белков, связанных с глутатион-агарозными шариками, и последующего Вестерн-блоттинга. Блоты зондировали с использованием кроличьей антисыворотки против МБР (продуцированной в нашей лаборатории) и козьего антикроличьего иммуноглобулина, конъюгированного с пероксидазой хрена.

iii) Индуцированная экспрессия p55-рецептора и его фрагментов в клетках HeLa

Клетки HeLa, экспрессирующие тетрациклин-контролируемый трансактиватор, разработанный Gossen и Bujard (клон HtTA-1 [Gossen и Bujard, 1992]), культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальную телячью сыворотку, 100мкг/мл пенициллина, 100мкг/мл стрептомицина и 0,5мг/мл неомицина. кДНК-вставки, кодирующие p55-R или его фрагменты, вводили в тетрациклин-контролируемый экспрессирующий вектор (pUHD 10-3, любезно предоставленный E. Bujard). Клетки трансфецировали экспрессионной конструкцией (5мкг ДНК/6см чашку) методом осаждения фосфатом кальция [Ausubel и др., 1994]. Результаты кратковременной экспрессии трансфецированных белков оценивали через соответствующие промежутки времени после трансфекции в присутствии или в отсутствие тетрациклина (1мкг/мл). Клоны клеток, стабильно трансфецированных p55-1C-кДНК человека в векторе pTNA 10-3, подтверждали путем трансфекции кДНК в клетки HtTA-1 в присутствии тетрациклина вместе с плазмидой, несущей ре-резистентность к гиромоцину, и последующего отбора на клоны, резистентные к гиромоцину (200мкг/мл). Экспрессию кДНК получали путем удаления тетрациклина, который в других случаях постоянно присутствовал в среде для роста клеток.

iv) Оценка TNF-подобных эффектов, стимулированных индуцированной экспрессией P55-R и его фрагментов

Влияние индуцированной экспрессии рецептора и TNF на жизнеспособность клеток оценивали методом поглощения нейтрального красного [Wallach, 1984]. Индуцирование экспрессии гена 1L-8 оценивали методом Нозерн-анализа. РНК выделяли с использованием TP1 REAGENT (Molecular Research Center, Inc.), затем денатурировали в формальдегид/формамидном буфере, подвергали электрофорезу на агарозном/формальдегидном геле, и блокировали на мембрану Gene Screen Plus (Du Pont) в 10×PE-буфере с использованием стандартной техники. Фильтры гибридизировали с 1L-8-кДНК-зондом [Matsushima, и др., 1988] (нуклеотиды 1-392), подвергали радиоактивному мечению с использованием набора для произвольного праймирования (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany), и промывали в жестких условиях в соответствии с инструкциями производителя. Авторадиографию осуществляли в течение 1-2 дней.

v) Оценка экспрессии рецептора TNF

Экспрессию TNF-рецептора в образцах 1×10⁶ клеток оценивали путем измерения связывания TNF, меченного [¹²⁵I] по ранее описанному методу с использованием хлорамина-T [Holtmann и Wallac, 1987]. Был также проведен анализ ELISA, осуществленный как описано в литературе для количественной оценки растворимых TNF-рецепторов [Aderka и др. 1991] за исключением того, что для лизиса клеток (70мкл/10⁶кл.) и для разведения тестируемых образцов использовали буфер RIPA (10мМ Трис-НCl, pH7,5, 150мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат, 0,1% ДСН, и 1мМ EDTA). Растворимая форма p55-R, выделенная из мочи, служила в качестве стандарта.

o) Мутационный анализ внутриклеточного домена p55-R (p55-1C) для определения областей p55-1C, участвующих в самоассоциации

Как указывалось выше, p55-1C обладает способностью к самоассоциации, и имеются такие области p55-1C, которые сами способны связываться с полноразмерным p55-1C. В частности, был идентифицирован один из фрагментов p55-1C (обозначенный белковым фрагментом 55.1 в Примере 1, см. выше), который способен к прочному связыванию с полноразмерным p55-1C; при этом, после секвенирования этого фрагмента было установлено, что он расположен между аминокислотными остатками 328 и 426 p55-TNF-рецептора и находится в p55-1C. Кроме того, было установлено (см. ниже), что вышеуказанная область, а именно, фрагмент 55.1 сам способен к самоассоциации и стимуляции цитотоксических эффектов на клетках. Поэтому эта область p55-1C была названа "доменом смерти", который расположен между аминокислотными остатками 328-426 p55-R человека, а по всей вероятности, состоит из аминокислотных остатков, находящихся между примерно остатком 328 и 414.

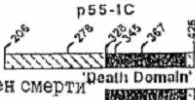
Тот факт, что "домен смерти" в p55-1C способен к самоассоциации, был обнаружен случайно. После скрининга кДНК-библиотеки клеток HeLa с использованием двухгибридной техники (см. выше, Пример 1) в целях выявления последовательностей, кодирующих белки, которые связываются с внутриклеточным доменом этого рецептора, было обнаружено среди кДНК, продукты, которых специфически связывались с гибридным белком "внутриклеточный домен – GALA DBD" несколько клонов (например, 55.1 и 55.3), непосредственно кодирующих области внутриклеточного домена p55-R, (p55-1C; отмечен звездочками в Таблице 3).

С использованием двухгибридного теста для оценки степени специфичности при самоассоциации p55-1C и для более точного определения области, участвующей в этой самоассоциации, были получены следующие данные (Таблица 3): а) самоассоциация p55-1C ограничивается областью, находящейся в "доме смерти". Ее N-конец расположен между остатками 328 и 344, а ее С-конец расположен вблизи остатка 404 и несколько выше от С-конца (как указано в литературе) этого домена (остаток 414). (b) Делеция мембрано проксимальной области p55-1C, расположенной выше "домена смерти", способствует усилению самоассоциации, что дает основание предположить, что эта область оказывает ингибирующее действие на ассоциацию. с) Мышиный p55-1C способен к самоассоциации, а также к связыванию с "доменом смерти" p55-R человека. d) Исследования самоассоциации внутриклеточных доменов трех других рецепторов, принадлежащих к семейству TAF/GF-рецепторов, а именно, рецептора FAS/APO1 (FAS-R), CD40 [Fields и

Song 1989] и p75-TNF-рецептора [Smith и др., 1990], показали, что FAS-1C, который передает цитотоксический сигнал с помощью определенной последовательности - "мотива", родственного "домену смерти" p55-R, способен к самоассоциации, и до некоторой степени к ассоциации с p55-1C. Однако, CD40-1C, который обеспечивает передачу рост-стимулирующих сигналов (даже несмотря на то, что он также содержит последовательность, похожую на "домен смерти"), и p75-1C., который структурно не похож на p55-1C, не имеют тенденции к самоассоциации, и не связываются с p55-1C или FAS-1C.

TABLE 3. Self-association of the intracellular domains of p55-R and Fas/APO1 within transformed yeasts : assessment by a two-hybrid β -galactosidase expression test.

Таблица 3. Самоассоциация внутриклеточных доменов p55-R и Fas/APO1 в трансформированных дрожжах: оценка с помощью двухгибридного теста на экспрессию β -галактозидазы

чел. p55-1C и делеционные мутанты		HUMAN p55-1C & DELETION MUTANTS								Другие белки OTHER PROTEINS						лактозидаза
		206-426	278-426	328-426	328-414	328-404	328-373	344-426	206-426	мышь	мышь	чел.	чел.			
		206-426	426*	426*	414	404	373	414	326	mouse p55-1C	mouse Fas-1C	human CD40-1C	human p75-1C	SNF1	pGAD-GH	
 "домен смерти"	HUMAN p55-1C & DELETION MUTANTS	206-426 (p55-1C)	5.0	3.6	44.5	30.3	3.5	0	0	0	—	—	—	—	0	
	чел. p55-1C и делеционные мутанты	328-426*	5.2	—	63.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	
		367-426	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		206-345	0	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		206-326	0	—	0	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
Другие белки	OTHER PROTEINS															
мышинный	mouse p55-1C	0.17	0.38	3.0	—	—	—	—	—	2.5	—	—	—	—	0	
мышинный	mouse Fas-1C	0	0	0.14	—	—	—	—	—	0	38.8	—	0	0	0	
чел.	hn CD40-1C	0	0	0	—	—	—	—	—	0	0	0	—	—	0	
чел.	human p75-1C	0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	0	
	SNF1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2.7	0	
Ламин	Lamin	0	0	0	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	0	
	pGBT9	0	0	0	—	—	—	—	—	0	0	—	—	—	—	

В вышеприведенной Таблице 3 проиллюстрирован количественный анализ взаимодействия GAL4-гибридных конструкций, включающих в себя следующие белки: внутриклеточный домен человека p55-R и его различные делеционные мутанты (остатки были пронумерованы, как [в работе Loetscher и др., (1990)] и обозначены здесь как SEQ ID No:25; мышинные внутриклеточные домены p55-R (остатки 334-454; пронумерованы как [в работе Goodwin и др., (1991)]); мышинный FAS/APO1, FAS-1C, остатки пронумерованы как [в работе Watanabe-Fukanaga и др., 1992]; чел. CD40 (CD40-10, 216-277, остатки пронумерованы, как [в работе Stamenovic и др., 1989]); и чел. p75-TNF-рецептор (p75-1C, 287-461, остатки пронумерованы как [в работе Smith и др., 1990]). SN F1 и SNF4 были использованы в качестве позитивных контролей для ассоциации [Field и Song 1989], а ламин был использован в качестве негативного контроля [Bartel и др., 1993]. Белки, кодируемые GAL4-AD-конструкциями (pGPT9), даны в вертикальной столбце, а белки, кодируемые GAL4-A1-конструкциями (pGAD-GH), даны горизонтально. Два делеционных мутанта, отмеченные звездочками, были клонированы путем двухгибридного скрининга кДНК-библиотеки клеток BeLa (Clontech, Palo Alto, Ca., U.S.A.) с использованием p55-1C, клонированного в pGBT9, в качестве "приманки". В этом скрининге, четыре из около 4×10^6 исследованных кДНК-клонов оказались положительными. При этом, было установлено, что три из этих клонов соответствуют участкам кДНК для p55-R человека (два идентичных клона, кодирующие остатки 328-426, и один клон, кодирующий остатки 277-426). Четвертый клон, как было обнаружено, кодировал неизвестный белок. Данные о экспрессии β -галактозидазы были получены как средние значения из анализов двух независимых трансформантов, и представлены как количество β -галактозидазного продукта (единицу активности определяли как $ОП_{420 \times 10^3} / ОП_{600}$ дрожжевой культуры, а реакционное время дано в минутах. Предел детекции в данном анализе составлял 0,05ед. Отклонения между дубликатными образцами, во всех случаях, составляли менее 25% от среднего значения (не определяли).

In vitro тест на взаимодействие бактериального гибридного белка "p55-1C-глутатион- S-трансфераза (GST)" с гибридным белком "p55-1C-мальтозосвязывающий белок (МБР)" подтвердил, что p55-R способен к самоассоциации, и исключил участие дрожжевых белков в этом связывании (см. выше). На указанную самоассоциацию не оказывали влияния ни повышенные концентрации соли, ни EDTA (см. выше).

Для оценки функциональной роли самоассоциации "домена смерти", мы исследовали механизм, по которому индуцированная экспрессия p55-R или его фрагментов влияет на клетки, восприимчивые к TNF-цитотоксичности. Результаты этого анализа показаны на Рис.7, на котором проиллюстрирована лиганд-независимая стимуляция цитотоксического эффекта в клетках HeLa, трансфецированных p55-R, его внутриклеточным доменом (p55-1C) или его фрагментами (включая "домен смерти").

На Рис.7 схематически показаны различные ДНК-молекулы, кодирующие различные типа TNF-

рецепторов, включенных в векторы, которыми были трансфецированы клетки HeLa (с левого края Рис.7); экспрессия (левый и средний столбцы); а также жизнеспособность (правый столбец) клеток HeLa, экспрессирующих кратковременно различные полноразмерные белки p55-R, p55-1C, или фрагменты p55-1C, либо в качестве контроля, люциферазу (LUC) (каждый из них показан с левой стороны Рис.7), при этом, экспрессию осуществляли с использованием тетрациклинконтролируемого экспрессирующего вектора. Незаштрихованные прямоугольники (в левом, среднем и правом столбцах) на Рис.7 соответствуют клеткам, трансфецированным в присутствии тетрациклина (1мкг/мл), который ингибирует экспрессию; а заштрихованные прямоугольники (в левом, среднем и правом столбцах) на Рис.7 соответствуют клеткам, трансфецированным в отсутствие тетрациклина. Экспрессию TNF-рецептора оценивали через 20 часов после трансфекции с использованием ELISA, и антител против внеклеточного домена рецептора (см. схематическую иллюстрацию на левой стороне Рис.7), а также путем определения связывания радиоактивно меченного TNF с клетками (средний столбец). Цитотоксичный эффект трансфецированных белков оценивали через 48 часов после трансфекции. Данные приводятся для 1-3 экспериментов с аналогичными количественными результатами, где каждую конструкцию использовали в дубликate. "ND"="не определяли".

Таким образом, из Рис.7 видно, что при использовании экспрессирующего вектора, осуществляющего строго контролируемую экспрессию трансфецированных кДНК с помощью тетрациклин-регулируемого трансактиватора [Gossen, и Bujard, 1992], простое увеличение экспрессии p55-R в клетках HeLa посредством кратковременной экспрессии трансфецированной кДНК, кодирующей полноразмерный рецептор, приводит к массивной гибели клеток. При экспрессии лишь одного p55-1C наблюдалась даже более высокая цитотоксичность. Значительный уровень цитотоксичности наблюдался также при экспрессии лишь части p55-1C, содержащей, в основном, "домен смерти" (остатки 328-426), в клетках HeLa. С другой стороны, экспрессия фрагментов p55-1C, в которых отсутствует "домен смерти" или содержится лишь его часть (или экспрессия гена люциферазы, используемого как нерелевантный контроль) не оказывала какого-либо действия на жизнеспособность клеток. Цитотоксичность p55-1C была, кроме того, подтверждена использованием клеток, стабильно трансформированных его кДНК. Эти клетки продолжали свой рост в случае, когда не индуцировалась экспрессия p55-1C, но при экспрессии p55-1C, клетки погибали (см. выше).

с) Другие функции внутриклеточного домена p55-TMP-рецептора

Для того, чтобы определить, стимулируются ли другие функции TWF самоассоциацией внутриклеточного домена, включающего "домен смерти", мы проанализировали действие повышенной экспрессии полноразмерного рецептора (p55-R) и экспрессии внутриклеточного домена рецептора (p55-1C) на транскрипцию интерлейкина-8 (1L-8), которая, как известно, активируется TNE [Matsushima и др., 1988]. Результаты этого исследования представлены на Рис.8, на котором проиллюстрировано лиганд-независимое индуцирование экспрессии гена 1L-8 в клетках HeLa, трансфецированных p55-R или p55-1C с использованием тетрациклинконтролируемой конструкции (см. также "Общие методы и материалы, и Пример 1). На панели А Рис.8 проиллюстрирован Нозерн-блот-анализ (см. выше, главу "Общие методы и материалы") РНК (7мкг/дорожка), экстрагированной из клеток HeLa (HT a-1), необработанных ("контроль") или обработанных ("TNF") TNF (500мкг/мл, 4 часа), или клеток HTa-1 через 24 часа после трансфекции (в присутствии или в отсутствие тетрациклина) кДНК для p55-1C ("p55-1C"), p55-R ("P55-R"), или люциферазы ("LUC"). На панели В Рис.8 проиллюстрирован Нозерн-блот-анализ, где проводили окрашивание 18S-rРНК метиленовым синим в каждом из образцов, показанных на панели А Рис.8.

Таким образом, как видно из Рис.8, трансфекция клеток HeLa тетрациклин-контролируемой конструкцией, содержащей p55-R-кДНК, индуцировала транскрипцию 1L-8. В клетках, трансфецированных кДНК для p55-1C, наблюдалось даже более сильное индуцирование. В обоих случаях, индуцирование происходило только при отсутствии тетрациклина в среде роста, что свидетельствует о том, что это индуцирование является результатом экспрессии трансфецированного p55-R или p55-1C. Трансфекция клеток кДНК люциферазы, используемой в качестве контроля, не оказывала какого-либо влияния на транскрипцию гена 1L-8.

Исходя из вышеуказанных результатов, очевидно, что простое увеличение экспрессии p55-R, или даже экспрессии только его внутриклеточного домена (p55-1C) является достаточным для индуцирования лиганд (TNF)-независимой цитотоксичности и других эффектов, включая также увеличение экспрессии гена 1L-8 в клетках. Индуцирование этих эффектов, по всей вероятности, обусловлено самоассоциацией внутриклеточного домена p55-R (p55-1C). Поскольку, как указывалось выше, очевидно, что после самоассоциации p55-1C, его "домен смерти", в первую очередь, ответственен за передачу сигнала, то возможно, что индуцирование внутриклеточных процессов, приводящих к стимуляции цитотоксичности в клетках, а также других эффектов, например, индуцирование экспрессии гена 1L-8, опосредовано другими областями p55-1C после их самоассоциации. Поэтому вполне возможно, что различные области p55-1C ответственны за различные TNF-индуцированные эффекты (например, цитотоксичность и индуцирование экспрессии гена 1L-8) в клетках, где указанные эффекты стимулируются в ответ на внутриклеточную передачу сигнала после самоассоциации p55-1C.

Тот факт, что p55-1C способен индуцировать лиганд (TNF)-независимую стимуляцию других внутриклеточных эффектов, например, индуцирование экспрессии гена 1L-8, означает, что p55-1C или его специфические фрагменты могут быть использованы в качестве высокоспецифического инструмента для осуществления нужных эффектов в клетках или тканях, не прибегая, при этом, к обработке этих клеток или тканей TNF. При многих патологических состояниях (например, злокачественные опухоли) обработка клеток фактором некроза опухолей (TNF), особенно в высоких дозах, может приводить к нежелательным побочным эффектам, системно индуцированным TNF после его связывания со своим рецептором. Благодаря настоящему изобретению было установлено, что p55-1C может имитировать другие специфические TNF-индуцированные эффекты (помимо цитотоксичности), например, индуцирование 1L-8, что открывает возможность клетко- или тканеспецифического введения p55-1C или его специфических фрагментов, которые способны к передаче сигнала для индуцирования желательных специфических внутриклеточных эффектов,

например, индуцирование 1L-8, и тем самым дает возможность избежать возникновения побочных эффектов, часто наблюдаемых в процессе TNF-обработки.

d) Лиганд-независимая стимуляция цитотоксических эффектов в клетках HeLa, индуцированная внутриклеточными доменами и "доменами смерти" p55-TNF-R и FAS-R (FAS/APO1)

Что касается цитотоксической активности внутриклеточных доменов p55 TNF-R и FAS-R (p551C и FAS-1C), то в соответствии с настоящим изобретением было также обнаружено, что p551C, его "домен смерти" (p55DD) и FAS-1C обладают способностью к лиганд-независимой стимуляции цитотоксического эффекта в клетках HeLa. Для этого, клетки HeLa были трансфецированы экспрессирующими векторами, содержащими различные конструкции либо их полноразмерного p55-TNF-R, его фрагментов, включая p551C и p55DD, либо из FAS-1C. В одном из экспериментов, клетки HeLa были котрансфецированы конструкциями, содержащими p55-TNF-R (p55-R) и FAS-1C (более подробно, эти конструкции и их получение описаны выше). Результаты этого исследования представлены на Рис.9 (А и В), где на левой стороне панелей А и В Рис.9 схематически показаны конструкции, использованные для трансфекции клеток HeLa; в двух средних столбцах этих панелей (второй и третий слева) графически представлены результаты экспрессии рецептора TNF или FAS; а в первой части панелей графически представлены результаты исследования жизнеспособности трансфецированных клеток. На Рис.9А представлены результаты для трансфецированных клеток HeLa, экспрессирующих (при кратковременной экспрессии) полноразмерный p55-R, p55-1C или его фрагменты, либо, в качестве контроля, люциферазу (LUC), причем, во всех случаях использовали вектор тетрациклин-контролируемой экспрессии. На Рис.9В представлены результаты для трансфецированных клеток HeLa, экспрессирующих (при кратковременной экспрессии) лишь один FAS-1C или вместе с p55-R; причем, эти результаты были получены с использованием вектора тетрациклин-контролируемой экспрессии. На диаграмме, изображенной на рис. 9А и 9В, незаштрихованные прямоугольники соответствуют клеткам, трансфецированным в присутствии тетрациклина (1мкг/мл), который ингибирует экспрессию, а заштрихованные прямоугольники соответствуют клеткам, трансфецированным в отсутствие тетрациклина. Экспрессию рецептора TNF оценивали через 20 часов после трансфекции посредством анализа ELISA с использованием антител против внеклеточного домена рецептора (см. левую часть панелей), и путем определения связывания радиоактивно меченного TNF с клетками (средние части панелей). Цитотоксический эффект трансфецированных белков оценивали через 48 часов после трансфекции. Данные приводятся из 1-3 экспериментов с аналогичными количественными результатами, где каждую конструкцию тестировали два раза. "ND" означает "не определяли". Из результатов, представленных на Рис.9А и 9В видно, что при экспрессии лишь одного p551C наблюдалась даже более высокая цитотоксичность. Значительный уровень цитотоксичности также наблюдался при экспрессии лишь "домена смерти" (p55DD). В противоположность этому, экспрессия фрагментов p551C, в которых отсутствовал "домен смерти" или содержался лишь его фрагмент, не влияла на жизнеспособность клеток. Экспрессия FAS-1C не приводила к значительной цитотоксичности, но, при этом, она усиливала цитотоксичность ко-экспрессируемого p55-R.

Пример 3

Другие белки, обладающие способностью связываться с внутриклеточными доменами P55-TNF-R или FAS-R

С использованием методики, описанной выше в Примере 1 были выделены и идентифицированы еще три белка, способные связываться с p551C или FAS-1C.

На Рис.10-12 схематически изображена частичная и предварительная нуклеотидная последовательность кДНК-клонов, обозначенных P2, P9, и DD11, соответственно.

Клоны F2 и F9, были выделены путем скрининга библиотеки мышиных эмбрионов с использованием мышиного FAS-1C в качестве "приманки". На Рис.10 схематически показана частичная нуклеотидная последовательность из; F2-кДНК, которая была секвенирована. На Рис.11 схематически показана частичная нуклеотидная последовательность из 1724 оснований от P9-кДНК, которая была секвенирована. Анализ связывающей способности белков, кодируемых клонами F2 и F9 (F2 и F9, соответственно), показал, что:

a) E2 сильно взаимодействует с p551C и p55DD человека и с FAS-1C мыши, но, при этом, он слабо взаимодействует с нерелевантными (контрольными) белками SNF1 и ламином, а также с релевантным (т.е., рассматриваемым в настоящем изобретении) белком FAS-1C человека;

b) F9 сильно взаимодействует с чел. p55-1C и мышиным FA-1C но слабо взаимодействует с чел. FA-1C (релевантный белок) и нерелевантными (т.е., не относящимися к настоящему изобретению) белками SNF1 и ламином;

c) Ни один из F2 и F9 не взаимодействует с чел. p751C, pGBT9 ("пустой" вектор- "приманка") или чел. CD-40.

Кроме того, исследования банков данных для генов и белков ("GeneBank" и "ProteinBank") показали, что F2 и F9 являются новыми белками.

Такими образом, F2 и F9 представляют собой новые белки, специфично связывающиеся с FAS-1C и p551C.

Клон DD11 был выделен путем скрининга HeLa-библиотеки человека с использованием в качестве "приманки" p55DD. На Рис.12 схематически показана частичная нуклеотидная последовательность из 425 оснований от DD11-кДНК, которая была секвенирована.

Клон DD11 имеет длину приблизительно 800 нуклеотидов. Полноразмерный транскрипт, длина которого составляет приблизительно 12kb, был зондирован с использованием этого клона. Анализ связывающей способности белка, кодируемого клоном DD11, показал, что DD11 сильно взаимодействует с p55DD (аминокислоты 326-414) (см. Рис.9) и не взаимодействует с делеционными мутантами этого домена, например, с "ак.326-404". DD11 также взаимодействует с мышиным и чел. FAS-1C, и до некоторой степени с ламином. Однако, DD11 не взаимодействует ни с SNF1, ни с pGBT9 ("пустой" вектор-"приманка"). Кроме того, он не был обнаружен ни в одном из банков данных ("Gene Bank" и "Protein Bank"). Таким образом DD11 представляет собой белок, специфически связывающийся с p551C (p551DD) и FAS-1C.

Пример 4

Конструирование растворимых димерных рецепторов TA7F-

Исходя из данных, полученных выше в Примере 2, на основании которых было установлено, что внутриклеточный домен p55-R (p55-1C) и его часть ("домен смерти"), а также внутриклеточный домен FAS/APO1 и его часть (также именуемая "доменом смерти"), похожая на "домен смерти" p55-1C, обладают способностью к самоассоциации, стало очевидным, что можно сконструировать новые TNF-рецепторы, которые способны к самоассоциации (агрегации), и которые являются растворимыми. Такими рецепторами могут быть гибридные белки, содержащие, в основном, весь внеклеточный домен p55-R, соединенный, в основном, с полным внутриклеточным доменом или его "доменом смерти" p55-R или FAS/APO1. Такие конструкции не содержат трансмембранный домен p55-R (FAS/APO1), а поэтому они являются растворимыми. Кроме того, благодаря способности к самоассоциации внутриклеточных доменов или их "доменов смерти", эти гибридные конструкции будут обладать способностью к олигомеризации с образованием, по крайней мере, димеров (а возможно и мультимеров более высокого порядка) p55-R. В соответствии с этим, такие димерные TNF-рецепторы (p55-R) будут способны связываться, по крайней мере, с двумя мономерами натурального гомотримера TNF, и тем самым образовывать растворимый TNF-рецептор, связывающийся с высокой степенью avidности со своим лигандом (гомотримерным TNF).

Исходя из вышеуказанного, могут быть сконструированы четыре типа p55-TNF-рецепторных гибридных белков, каждый из которых обладает способностью к олигомеризации и является растворимым:

i) Гибридный продукт, образованный между внеклеточным доменом p55-R (EC55) и внутриклеточным доменом p55-R (p55-1C);

ii) Гибридный продукт, образованный между EC55 и "доменом смерти" p55-1C C(DD55);

iii) Гибридный продукт, образованный между EC55 и внутриклеточным доменом FaS/APO1 (1CFAS); и

IV) Гибридный продукт, образованный между EC55 и "доменом смерти" 1CFAS (DDFAS).

В каждом из вышеуказанных гибридных белков, способному к связыванию с мономером. TNF обеспечивается EC55-частью белка, тогда, как олигомеризация (или, по крайней мере, димеризация) каждого из указанных типов белков обеспечивается его "хвостовой" частью, являющейся любой из областей p551C, DD55, 1CFAD, или DDFAS.

Для конструирования вышеуказанных гибридных белков может быть использована стандартная техника рекомбинантных ДНК, которая в настоящее время широко используется специалистами [см. например, Sambrook и др., (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.]. Для этих целей может быть использован любой подходящий экспрессирующий вектор (система клонирования или плазида, предназначенная для экспрессии выбранной инсертированной ДНК), который происходит от бактерий, бактериофагов, или вирусов животных, и в который может быть введена, в одну или несколько стадий, ДНК, кодирующая EC55 и один из "хвостов" являющихся p55-1C, DD55, 1CFAS или DDFAS. Инсертированная таким образом ДНК, кодирующая каждый из гибридных белков, может быть помещена под контроль различных регуляторных последовательностей системы клонирования или плазмиды, например, таких, как промоторы, сайты связывания с рибосомой, сайты связывания факторов транскрипции, и т.п. Выбор таких регулирующих экспрессию последовательностей зависит от типа выбранного экспрессирующего вектора, а следовательно от типа клетки-хозяина (эукариотической или прокариотической), в которой желательно экспрессировать гибридные белки настоящего изобретения. Предпочтительными клетками-хозяевами (а следовательно и экспрессирующими векторами) являются эукариотические клетки, а в частности, клетки млекопитающих.

ДНК-молекула, кодирующая каждый из вышеуказанных гибридных белков, может быть получена и инсертирована в экспрессирующий вектор нижеследующих процедур:

а) Сначала, с использованием стандартной техники, конструируют серию олигонуклеотидов для использования в полимеразной цепной реакции, где указанными олигонуклеотидами являются:

```
1) ACC ATG GGC CTC TCC ACC GTG (EC55, смысловой), SEQ
ID NO:1;
2) ACGC GTC GAC TGT G.GT G.CC TGA QTC CTC (EC55, анти-
смысловой), SEQ ID NO:2;
3) ACGC GTC GAC CGC TAG CAA CGG TGG AAG (1C55, смысло-
вой), SEQ ID NO:3;
4) TCA TCT GAG AAG ACT GGG (1C55, антисмысловой), SEQ
ID NO:4;
5) ACGC GAG GAC AAG AGA AAG GAA CTA CAG (1CFA, смысло-
вой), SEQ ID NO:5;
6) CTA GAC CAA GCT TTG GAT (1CFA, антисмысловой), SEQ
ID NO:6;
7) ACCC CTC CAC CCC CCC ACC CTC TAC CCC (DD55;
смысловой), SEQ ID NO:7;
8) ACGC GTC GAC GAT CTT CAC TTG AGT AAA (DDFA,
смысловой), SEQ ID NO:8.
```

б) Плазмиды, содержащие клоны полноразмерного p55-R и FAS/APO1-рецептора, и полученные в нашей лаборатории (см. также одновременно рассматриваемую [заявку EP568925] и Примеры 1-3 настоящей заявки), подвергают нижеследующим манипуляциям с получением ДНК-фрагментов, которые кодируют каждый из гибридных белков, и которые затем лигируют в вышеуказанный выбранный экспрессирующий вектор:

i) Для получения ДНК-фрагмента, кодирующего EC55, который является компонентом всех четырех гибридных белков, осуществляют PCR на плазмиде, несущей кДНК чел. p55, с использованием вышеуказанных олигонуклеотидов №№1 и 2 (размер фрагмента составляет 640п.о.).

ii) Для получения гибридного продукта EC55-1C55, осуществляют PCR на плазмиде, несущей кДНК чел. p55, с использованием олигонуклеотида №№3 и 4, в результате чего получают ДНК-фрагмент, кодирующий 1C55 (размером 677п.о.), который затем смешивают с EC55, гидролизированным ферментом Sall, и лигируют по тупым концам в любой экспрессирующий вектор под контроль соответствующего промотора. Ориентацию последовательности EC55-1C55, инсертированный в вектор, проверяют путем рестрикционного гидролиза и путем секвенирования.

iii) Для получения гибридного продукта EC55-1C FА продуцируют 1CFAS с помощью PCR на плазмиде, несущей кДНК для FAS, с использованием олигонуклеотида №№5 и 6, в результате чего получают фрагмент (размером 448п.о.), который затем разрезают ферментом Sall и смешивают с EC55, разрезанным ферментом Sall, после чего лигируют по тупым концам в экспрессирующий вектор под контроль соответствующего промотора. Ориентацию инсертированного EC55-1CFAS в векторе проверяют путем рестрикционного гидролиза и секвенирования.

iv) Для получения гибридного продукта EC55-DD55, продуцируют ДНК-фрагмент, содержащий DD55-последовательность, с помощью PCR на кДНК, кодирующей чел.p55, и с использованием олигонуклеотида №№7 и 4. Полученный продукт размером 314п.о. разрезают ферментом Sall и смешивают с EC55, разрезанным DD11, после чего лигируют по тупым концам в экспрессирующий вектор млекопитающего. Ориентацию инсертированного продукта EC55-DD55 в векторе проверяют путем рестрикционного гидролиза и секвенирования.

v) Для получения гибридного продукта EC55-DD FAS, продуцируют ДНК-фрагмент, кодирующий DDFAS с помощью PCR на FAS-кДНК с использованием олигонуклеотида №№6 и 8. Полученный продукт размером 332п.о. разрезают ферментом Sall и смешивают с EC55, гидролизированным Sall, после чего лигируют по тупым концам в экспрессирующий вектор млекопитающего. Ориентацию инсертированного продукта EC55-DDFAS в векторе проверяют путем рестрикционного гидролиза и секвенирования.

После конструирования вышеописанных экспрессирующих векторов, они могут быть введены, в целях их экспрессии, в подходящие клетки млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO), или клетки почки обезьяны (COS)) с использованием стандартных методов. Экспрессированные таким образом гибридные белки могут быть очищены стандартными методами [см., одновременно рассматриваемые заявки EP 308378; EP 398327; и EP 568925]. Очищенные гибридные белки могут быть, затем проанализированы на их способность к олигомеризации (и степень такой олигомеризации, т.е., способность белков образовывать димеры или мультимеры более высокого порядка), а также на их способность связываться с TNF (и аффинность или авидность такого связывания).

Пример 5

Конструирование растворимых димерных рецепторов FAS/APO1

Способом, аналогичным способу, описанному в Примере 4, могут быть продуцированы четыре типа гибридных FAS/APO1-белков, каждый из которых обладает способностью к олигомеризации и является растворимым; а именно:

i) Гибридный продукт, образованный между внеклеточным доменом FAS/APO1 (EC FAS) и внутриклеточным доменом p55-1C;

ii) Гибридный продукт, образованный между EC FAS и "доменом смерти" p55-1C (DD55);

iii) Гибридный продукт, образованный между EC FAS и внутриклеточным доменом FAS/APO1 (1C FAS); и

iv) Гибридный продукт, образованный между EC FAS и "доменом смерти" 1C FAS (DDFAS).

В каждом из вышеуказанных гибридных белков, способность к связыванию с лигандом FAS обеспечивается EC FAS-частью белка, тогда, как олигомеризация (или, по крайней мере, димеризация) каждого из указанных типов гибридных белков обеспечивается его "хвостовой" частью, являющейся любой из областей p55-1C, DD55, 1C FAS, или DDFAS.

Конструкции ДНК-фрагментов, кодирующих вышеуказанные гибридные белки, и экспрессирующие векторы, содержащие эти конструкции, могут быть получены, как описано в Примере 4, за исключением того, что при этом, должны использоваться другие подходящие олигонуклеотиды (не показаны), после чего эти конструкции могут быть использованы для получения фрагмента EC FAS, предназначенного для лигирования с любой из вышеуказанных "хвостовых" частей. После этого, экспрессирующие векторы могут быть введены в подходящие клетки-хозяева, и полученные в результате экспрессии гибридные белки могут быть очищены и проанализированы на их способность к олигомеризации (и степень такой олигомеризации, т.е., на способность этих белков образовывать димеры или мультимеры более высокого порядка), а также на их способность связываться с FAS-лигандом (и аффинность или авидность такого связывания).

Пример 6

Конструирование растворимых олигомерных "смешанных" рецепторов TNF/FAS

В целях получения олигомерных рецепторов, обладающих "смешанной" аффинностью, т.е., сродством двум лигандам, TNF и FAS-R-лиганду, вышеупомянутые гибридные белки (Примеры 4 и 5) могут быть использованы в нижеследующих процедурах:

i) получение гибридного продукта, описанного в Примере 4, и содержащего внеклеточный домен TNF-R (p75 TNF или p55-TNF-R), соединенный с одним из: p55-1C, FAS-1C, p55DD, или FASDD;

ii) получение гибридного продукта, описанного в Примере 5, и содержащего внеклеточный домен FAS-R, соединенный с одним из: p551C, FAS-1C, p55DD, или FAS-DD; и

iii) смешивание любого одного из гибридных продуктов (i) с любым одним из гибридных продуктов (ii) для получения нового димерного (или олигомерного более высокого порядка) рецептора, который содержит оба внеклеточных домена TNF-R и FAS-R, соединенные посредством их -1C или -DD-областей.

В вышеуказанных процедурах, гибридные продукты (i) и (ii) могут быть получены отдельно, а именно, в результате их выделения из трансформированных клеток, в которых они были продуцированы, а затем, эти продукты могут быть смешаны *in vitro* с образованием рецепторов со "смешанной" аффинностью. Альтернативно, клетки-хозяева могут быть трансфицированы векторами, несущими последовательности,

кодирующие гибридные белки обоих типов; причем, в этом случае, рецепторы со "смешанной" аффинностью могут быть получены непосредственно из ко-трансфицированных клеток. Фактически, олигомеризация гибридных продуктов с образованием олигомерных рецепторов может происходить в клетках во время или после процедуры очистки, в результате чего, могут быть получены гибридные продукты, экспрессированные в клетках. Для специфического отбора рецепторов со "смешанной" аффинностью может быть применен любой известный метод, например, аффинная хроматография, в которой для выявления рецепторов, имеющих внеклеточные домены обоих типов, используют, в последовательных хроматографических стадиях, антитела против внеклеточных доменов TNF-R и FAS-R.

Ссылки:

- Aderka, D., Englemann, H., Homik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D. and Kushtai, G. (1991) *Cancer Res.* 51:5602-5607.
- Baens et al. (1993) *Genomics* 16:214-218.
- Barinaga, M. (1993) *Science* 262,1512-4.
- Bartel, P.L., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) *Bio Techniques* 14, 920-924.
- Berger, J., Hauber, J., Hauber, R., Geiger, R. and Cullen, B.R. (1988) *Gene* 66, 1-10.
- Beutler, B. and Cerami, C (1987) *NEJM*, 116:379-385.
- Boldin, M.P. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 337-341.
- Bollon, D.P. et al. (1980) *J. Clin. Hematol. Oncol.* 10, 39-48.
- Botstein, D. et al. (1982) *Miami Wint. Smp.* 19, 265-274.
- Brakebusch, C et al. (1992) *EMBO J.*, 11:943-950.
- Broach, J.R. (1981) in: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 445-470.
- Broach, J.R. (1982) *Cell* 28, 203-204.
- Brockhaus, M. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3127-3131.
- Cantor, G.H. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10932-6.
- Chater, K.F. et al. (1986) in: *Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology*, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 45-54.
- Chen, C.J. et al. (1992) *Ann N.Y. Acad. Sci.* 660:271-3.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C Shapiro, J.P. Brauer, M., Kiefer, M.C., Barr, P.J. and Mountz, J.D. (1994) *Science* 263 1759-1762.
- Crisell, P. et al., (1993) *Nucleic Acids Res. (England)* 21(22):5251-5.
- Crowe, P.D. et al., (1994) *Science*, 264:707-709.
- Current protocols in molecular biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., eds.), (1994) pp.8.1.1-8.1.6 and 16.7-16.7.8, Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C. and Slaughter, C A (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 20878-20884.
- Dirks, W., Wirth, M. and Hauser, H. (1993) *Gene* 128, 247-249.
- Endo, H., Akahoshi, T., Nishimura, A., Tonegawa, M., Takagishi, K., Kashiwazaki, Matsushima, K. and Kondo, H. (1994) *Clin. Exp. Immunol.* 96, 31-35.
- Engelmann, H. et al. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 1531-1536.
- Ferrick, M.R., Thureau, S.R., Oppenheim, M.H., Herbolt, C.P., Ni, M., Zachariae, C.P., Matsushima, K. and Chan, C.C. (1991) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 1534-1539.
- Fields, S. and Song, O. (1989) *Nature*, 340:245-246.
- Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993) *Anal. Biochem.* 210, 179-187.
- Glick, B.R. (1987) *J. Ind. Microbiol.* 1, 277-282.
- Goodwin, R.G., Anderson, D., Jerzy, R., David, T., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Smith, C A (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 3020-3026.
- Gossen, M. and Boujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551.
- Gryczan, T. (1982) *The Molecular Biology of the Bacilli*. Academic Press, N.Y. 307-329.
- Guarente, L. (1983) in *Methods Enzymol.* 101, 181-191.
- Harada, A., Sekido, N., Kuno, A., Akiyama, M., Kasahara, T., Nakanishi, I., Mukaid, and Matsushima, K. (1993) *Int. Immunol.* 5, 681-690.
- Heller, R.A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6151-6155.
- Hohmann, H.-P. et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934.
- Holtmann, H. and Wallach, D. (1987) *J. Immunol.* 139, 1161-1167.
- Itoh, N. et al. (1991) *Cell* 66:233.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10932-7.
- Izaki, K. (1978) *Jpn. J. Bacteriol.* 33, 729-742.
- John, J.F. et al. (1986) *Rev. Infect. Dis.* 8, 693-704.
- Joseph, S. and Burke, J.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:24515-8.
- Kendall, K.J. et al (1987) *J. Bacteriol* 169, 4177-4183.
- Khan, A.S. et al. (1992) *Nature Genetics*, 2: 180-185.
- Koizumi, M. et al. (1993) *Biol. Pharm. Bull (Japan)* 16 (9):879-83.
- Kunkel, T.A. (1994) in: *Current protocols in molecular biology*, pp.8.1.1-8.1.6 (Ausubel, F.M. et al., eds.) Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc., New York.
- Loetscher, H., Pan, Y-C.E., Lahm, H.-W, Gentz, R., Brockhaud, M., Tabuchi, H. and Lesslauer, W. (1990) *Cell*, 61:351-359.
- Maniatis, T. et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

- Maniatis, T. (1980) in: *Cell Biology: A Comprehensive Treatise Vol.3: Gene Expression*. Academic Press, N.Y. 563-608.
- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J. and Oppenheim, J.J. (1988) *J. Exp. Med.* 167, 1883-1893.
- Nophar Y. et al. (1990) *EMBO J.*, 9:3269-3278.
- Oehm, A. et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:10709.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. and Nagata, S. (1993) *Nature* 364, 806-809.
- Okayama, H. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3, 280.
- O'Neal, K.D. and Yu-Lee, L.Y. (1993) *Lymphokine Cytokine Res.* 12 309-312.
- Piquet, P.F. et al. (1987) *J. Exp. Med.*, 166:1280-89.
- Realini, C., Rogers, S.W. and Rechsteiner, M. (1994) *FEBS Lett* 348, 109-113.
- Rechsteiner, M., Hoffman, Land Dubiel, W. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6065-6068.
- 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.
- Schwalb et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (14): 9949-54.
- Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) *FASEB J.* in press.
- Sekido, N., Mujaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., Matsushima, K. (1993) *Nature* 365, 654-657.
- Shimayama, T. et al., (1993) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 29:177-8.
- Shore, S.K. et al. (1993) *Oncogene* 8:3183-8.
- Smith, C.A., David, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D. and Goodwin, R.G. (1990) *Science*, 248:1019-1023.
- Smith, D.B. and Corcoran, L.M. (1994) in: *Current protocols in molecular biology*, pp.16.7.1-16.7.8 (Ausubel, F.M. et al., eds.) Greene Publishing Associates, Inc. and Wiley & Sons, Inc. New York.
- Song, H.Y. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22492-22495.
- Stamenkovic, I., Clark, E.A. and Seed, B. (1989) *Embo J.* 8:1403-1410.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) *Cell*, 74:845-853.
- Tracey, J.T. et al. (1987) *Nature*, 330:662-664.
- Wallach, D. (1984) *J. Immunol.* 132, 2464-9.
- Wallach, D. (1986) in: *Interferon 7* (Ion Gresser, ed.), pp.83-122, Academic Press, London.
- Wallach, D. et al. (1994) *Cytokine* 6, 556.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nagata, S. (1992) *J. Immunol.* 148, 1274-1279.
- Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) *Nature*, 356, 314-317.
- Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Kronke, M. (1994) *Cell* 78, 1005-1015.
- Wilks, A.F. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1603-1607.
- Zhao, J.J. and Pick, L. (1993) *Nature (England)* 365:448-51.

1	ATTCGCGTTC	AGGCTTACCA	CTCTCTACCA	GAAGCTCTG	40	CCGCGCTTCA	CTACAGCCG	AGCGGACAG	AGCGCGGCA	80
10	TTCCCGGGAG	AAAGACAAAG	AAACAGACCT	GTCTGAAGAG	50	CTACAGACCT	TTACAGATCA	ACTGGAGATG	CTCTGACAG	90
20	161	GACTTGGGCA	TAAGGATACA	TTCCCTGATC	60	GAAGGATTTG	CCAGAGGAGA	TTCCCTTCTC	TTACAGCTTC	100
30	241	ATTCCTTCAG	TTCCCAAGCC	TTCTAAATTT	70	ACTTATGCGA	ACTGAAAGCA	ATCTATGACA	ACATGGCCCC	110
40	321	TGGGAGCAAT	AAAGCTTTTG	CTCTGAACAT	80	TTGAGGATCA	CCATGAGTGG	GAAGGCTGAG	TTCCCTCAAT	120
50	401	ATTCGACATG	GGGCTCCAG	GAGCAATTTG	90	TTGAGGATCA	CCATGAGTGG	GAAGGCTGAG	TTCCCTCAAT	130
60	481	GACTTGGGCA	AGCTTCATCA	CCGAGAGAGG	100	AGCTTCATCA	CCATGAGTGG	GAAGGCTGAG	TTCCCTCAAT	140
70	561	CAATGCGCCG	AAATGCAAGG	ATGAGGCTTG	110	ATGAGGCTTG	AAATGCAAGG	ATGAGGCTTG	AAATGCAAGG	120
80	641	ATTCAGATTC	ATATTCAGAG	GTCTTCCTTT	130	ATTCAGATTC	ATATTCAGAG	GTCTTCCTTT	ATTCAGATTC	140
90	721	CTCCGCTTTC	CCCTGCTGAT	GTCTCCAGAG	150	CTCCGCTTTC	CCCTGCTGAT	GTCTCCAGAG	CTCCGCTTTC	160
100	801	GAATTTCTCA	GAAGCAATCT	TTACCTCTCT	170	GAATTTCTCA	GAAGCAATCT	TTACCTCTCT	GAATTTCTCA	180
110	881	CAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	190	CAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	CAATTTCTCA	200
120	961	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	210	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	220
130	1041	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	230	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	240
140	1121	ATTCAGATTC	TTCCCAAGAG	AAATGCAAGG	250	ATTCAGATTC	TTCCCAAGAG	AAATGCAAGG	ATTCAGATTC	260
150	1201	ATTCAGATTC	TTCCCAAGAG	AAATGCAAGG	270	ATTCAGATTC	TTCCCAAGAG	AAATGCAAGG	ATTCAGATTC	280
160	1281	CTCTGAGGAG	TTACATTAAT	GAGGAGCTCT	290	CTCTGAGGAG	TTACATTAAT	GAGGAGCTCT	CTCTGAGGAG	300
170	1361	CTCTGAGGAG	TTACATTAAT	GAGGAGCTCT	310	CTCTGAGGAG	TTACATTAAT	GAGGAGCTCT	CTCTGAGGAG	320
180	1441	TAATCTTGGT	CAATTCCTCA	AGATTCCTCA	330	TAATCTTGGT	CAATTCCTCA	AGATTCCTCA	TAATCTTGGT	340
190	1521	AGCTTACACA	GCTTAACTCT	GTGCAATCAT	350	AGCTTACACA	GCTTAACTCT	GTGCAATCAT	AGCTTACACA	360
200	1601	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	370	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	380
210	1681	AAAGGCTGAG	CCATTCAGAG	AAATGCAAGG	390	AAAGGCTGAG	CCATTCAGAG	AAATGCAAGG	AAAGGCTGAG	400
220	1761	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	410	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	GAATTTCTCA	420
230	1841	CCAGAGGAG	GAAGGAGAG	AAATGCAAGG	430	CCAGAGGAG	GAAGGAGAG	AAATGCAAGG	CCAGAGGAG	440
240	1921	CAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	450	CAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	CAATTCAGCA	460
250	2001	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	470	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	480
260	2081	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	490	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	500
270	2161	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	510	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	520
280	2241	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	530	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	540
290	2321	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	550	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	560
300	2401	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	570	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	580
310	2481	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	590	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	600
320	2561	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	610	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	620
330	2641	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	630	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	640
340	2721	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	650	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	660
350	2801	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	670	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	680
360	2881	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	690	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	700
370	2961	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	710	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	720
380	3041	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	730	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	740
390	3121	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	750	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	760
400	3201	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	770	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	780
410	3281	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	790	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	800
420	3361	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	810	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	820
430	3441	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	830	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	840
440	3521	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	850	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	860
450	3601	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	870	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	880
460	3681	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	890	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	900
470	3761	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	910	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	920
480	3841	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	930	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	940
490	3921	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	950	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	960
500	4001	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	970	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	980
510	4081	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	990	TAATTCAGCA	GTCAAGACAT	GAGCTCAAGG	TAATTCAGCA	1000

FIGURE 1a
Рис. 1a

(b) 75.3

5' GAATTCGGCAGCAGCGGCGAGGACAGAGTGGAGCTCTGTCTCTTAAATATAATA
 AAAATAAAAATAAAAATGTGGGGCCGGGCAAGGTGGCTCATGCCCTGTAATCCAGCACCTT
 GGGAGGCTGAGGCGAGGAGGATTGCCTAAGCCAGGAGTTTGACATCAGCCTGGGCAACAT
 GGTGAAACCCCATCTCTACAAAAATGCAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGGTGTGCTCCT
 ATAGTCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTAGAGGGGATCACCTGAGCCAGGAAGTTTGG
 AGGCTATAGTGAAGTGAAGACCCGACCATTTGCAGCCAGCCTGGAGCAAGAGACNCTGT
 CTCCACATAAAATAAATAAAATGAGTGGGGAACCTCTGTGTAAAGTCAGAAAGGCAC
 CACACAATTTGNATAGCCANCAACCATATTCAATACCCAATCTCTTTATTGCAATATAAG
 TATTTGTAAACCCCTACACAAATATTTCCCAAGAATAAGTTGGAATATAAATTACTATATC
 AATCANCCAAATAAAATAAACACATACAGTACTTATTTCCCTGTTGCTCCATATAAGCTT
 TGCTATTTCAATATAAAGCTTACCTAGTATGCTCATTTGAGCCTGAGCAGAGAAATATGCC
 CAGCTCGTGGCGAATTC...GGCGNTCTGACTCTCTACTGAACCAAGACTGAATCAGA
 GAGACTCGAGTGCNCTTATTTGATTAAACCCAAATTAATTGAAACCTNTGATTTTCTG
 AGGNGGATGATAAAGATGTGAAAGTGTGATGAACAGTGTGTATCCCTACTCTTGTATCCTG
 GAACAGACAGCAAGCAAGAGCTTTGATTGAAAGCCTATGTGAAAGCTGGTCAAAATTCGC
 GAGGTGAACGCCCGCTCTCTGAGACTGCACTGTGTTAAGCAACCTTTCCACGGGATGGAT
 AAGAATACTCCTGTAAAGATACACAGTGTATTGACAGCCTTATTAAGTGGCAGCATCTTGT
 GGGGCCATCCAGTACATCCCAACTGAGCTGAGTCAAGTTAGAAAATGGATTTCTGACTGG
 AATCTCACCAGTGAAAAAAAGCACACCCTTTAAGACTACTTTATGAGGCACCTTGTGGAT
 TGTAAAGAAAGTGTGATGCTGCTTCAAAAGTCAATGGTGGAAATGCTCGGAAGTTACACAGAG
 GACAATGCTTCCAGGCTCGAGTTGATGCCACAGGTGTATTGTACGAGCATTGAAAGAT
 CCAATGCAATTTCTTTGTGACCACCTTCTTACTTTAAACCAGTCAAGTTTGTGGAAGGC
 GAGCTTATTGATGATCTTTTAAACATTGTGTGAGTGTCTAAATGGCATCATATGTCAAG
 TTTTATCAGAAATAAAGACTTCATTGATCACTTGGCCTGTTACATGAACAGAAATATG
 GCAAAATGAGACTACTTACTTTTATGGGAATGGCAGTAGAAAATAAGGAAATTTCTTTT
 GACACAAATGACGCAAGAACTTCAGATTGGAGCTGATGATGTTGAAGCATTGTTATTGAC
 GCCGTAAAGAACTAAATGGTCTACTGCAAAATGATCAGACCCAGAGAAAAGTAGTTGTC
 AGTCATAGCACACATCGGACATTTGGAAAACAGCAGTGGCAACAACTGTATGACACACTT
 AATGCCCTGGAACAAAATCTGAACAAAGTGAACAAACAGCCTTTTGAGTCTTTCTGATACC
 TGAGTTTTTATGCTTATAATTTTTTGTCTTTGAAAAAAAGCCCTAAATCATAGTAAAC
 ATTATAAACTAAAAAATAAAAAAATAAATTCGAG 3'

FIGURE 1b

FIG. 1b

(c) 75.16

5' GTCCGGTTTACTTTAACTTAGTTTTGCATAGTTCTAGTGCACGTGAAATGAAAAGTTA
 TTTCCCTTTAGCTGTGTTATTATAGAGCAGAAATTCGTGTTTTAAAAATTAGCCTAAGATA
 TACTTGTTTTTGTAAAGAAAAATATTTAATGCTTGAACAAAATAAATGGAGTTGGAGTAG
 AATGTAGTTTGGAGAAATTTGAGCTTCCAAATGCTCTG...CAGAGGCATTGGAAGCT
 GCAAAATTTCCCAAACTACATTTCTACTCCAACTCCAAATTTATTTGTTCAGCATTAAATA
 TTTTCTTTACAAAAACAAGTATATCTTAGGCTAATTTTAAACAGAAATTTCTGCTCTA
 TAATAACACAGCTAAAGGGAAATTAATTTTCAATTTACAGTGCATAGAACTATGCAAAAC
 TAAGTTAAAGTAATACCGGAC 3'

FIGURE 1c

FIG. 1c

55.11per length: 900 March 10, 1995 19:08 Type: P Check: 9498 ..
 1 RVOPOOSTPA ARGSTDEKPS GREKNDAGDK DKOELESEED KOLODEL
 51 VERUGKDOTS LYRPALEED ROIRSTTSM TSVKPKLFL SPYKSKIKET
 101 YEMHATGENK RFADIIISVL AMTKSGENEC IKYHLYGSOE ELASMOIEYV
 151 RHLAGEVAKK MOELDIDNEKY OREPLITLYK EIVUYHMAIN AENECODIM
 201 EIKOVDMLEK DIDENAVAKY CLYUTSCVNY VPEPENSALL RCALGVFKKF
 251 TREPEALYLA IMYIDIMELVE DIFTSCKOVY VOKOMAFMIG RHGVPLELSE
 301 DVEEYEDL*TE IMENVOHNSN FLALAREIDI MEKVPKPDIV KTYLENHNEG
 351 GSCSOVUSAR MCLASFEKNG MGNAMFGODK LTODGSKYL YKKNODISM,S
 401 AASISGMILY MDVDSGITOT DKYXSEEDY IKSGALLACG LVSQVIMES
 451 DEYALLESYU YHNSHTNRL GSELEIGAY AGSNEBIVLT LYLDEYKESK
 501 SSMEVAGVTA LACSYLVGS SNGDYSTLL OTIMKAZETE LYOTATAMLE
 551 IGGYNHNGK SGALDALLA DEUSSEFEYS EGNLYDUSCA YAGSNVLYKY
 601 QDMLICSEH FSKKKEKDK DJEKKKDK KENDAMJN OQVAVLSTAL
 651 IANGKEIGAE MALTTEGHL, RVGEPTLARA VPLALISV SNPKIMILDT
 701 LSKFSHIDNR EYVUNSIETAM GNVGSGTINNA VLAAMLYOLA QYHAKRPNIL
 751 FVCHLADOGYT NIKSGTTLG RYHSDROAMS QVAVAGILTY LVAFIDVYNI
 801 ILKSGIVULY GIVADQRYM LVTFDELYAR LVPSVNGDA VDVUGOAKR
 851 KTYTGOTIT TVLLANIGER AELATERFLR VTPLEBIVTI FSKTYINISK
 Underlined: Homology to seqs
 Bold - basic cluster, nuclear localisation signal
 * end of head

Подчеркнуто: томология с SANK
 жирный шрифт: основной кластер, сигнал ядерной локализации
 * конец "головки"

FIGURE 1d

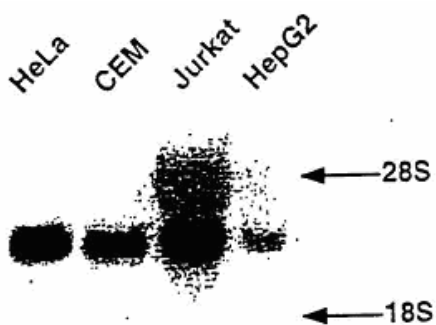


FIGURE 2

Рисунок 2

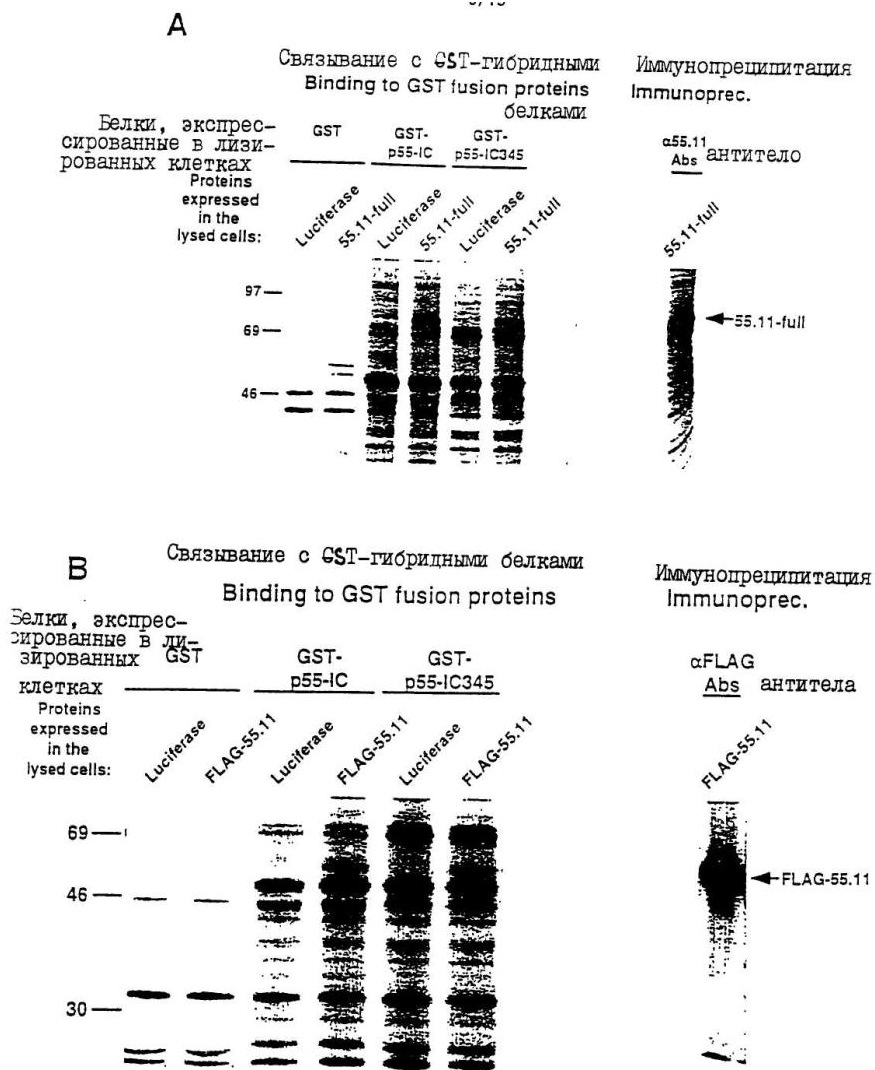


FIGURE 3
Рисунок 3

55.11(human)	K K H Q P Q D S P A A A	567	человек
YHR027c(yeast)	K K H Q P Q D S P A A A	567	дрожжи
SEN3(yeast)	K K H Q P Q D S P A A A	567	дрожжи
55.11(human)	K D T S L Y R P A L E E L P R Q I R S S T S M T S V P K P L K F L R E H V G V P K E I V E N H A P G E N R F A A Q I	611	человек
YHR027c(yeast)	D D S S L Y R P A L E E L P R Q I R S S T S M T S V P K P L K F L R E H V G V P K E I V E N H A P G E N R F A A Q I	611	дрожжи
SEN3(yeast)	N Q D S V K T Y A L E S I N N V M D	611	дрожжи
55.11(human)	I S V P A M T H S G E R E C L K Y R T V G S Q E E L A S H G E Y V R H L A G E V A K E T Q E L D D A E K V Q	171	человек
YHR027c(yeast)	I S V P A M T H S G E R E C L K Y R T V G S Q E E L A S H G E Y V R H L A G E V A K E T Q E L D D A E K V Q	171	дрожжи
SEN3(yeast)	A I A K V Y V N L G E Y E S A V E Y A A A K D R F D I D E K S Q F E T I V S K S I E H V Q E A S P Q Y T K D E Q	171	дрожжи
55.11(human) R S P L D T V K E I V P Y N H A R M A S H E A C D L L M E T E Q V U H L E K D	213	человек
YHR027c(yeast)	S D G S K S D G S A A T S G F E F S K E D T D R U C L D I V P Y F L K H H C E D A V D L L E T E S I D K L P Q F V U	213	дрожжи
SEN3(yeast)	F Y T K D I I D P K L T S I F E R H I E K C U K A S E L K L A L G T A L E G Y R L D I T E S A L A S K L N Q D S T S E N	213	дрожжи
55.11(human)	E H A Y A K V C L Y L T S C V N Y V E P E N S A L I R C A L G V F R K F T R F P E A L R L A L M H I H E L V E D I E	273	человек
YHR027c(yeast)	E H A Y A K V C L Y L T S C V N Y V E P E N S A L I R C A L G V F R K F T R F P E A L R L A L M H I H E L V E D I E	273	дрожжи
SEN3(yeast)	V K I I N Y L L T L A I T T V T N S K F R S S I L R K S F D F L H N H P N C D Y L T L N K V V N H I P A G L A L Q L E	273	дрожжи
55.11(human)	T S C E V V V Q K Q A F M L G R H G V F I E L S E D V E E Y S O L T E F S H V Q L N S N F A L A R E L D I M E H	333	человек
YHR027c(yeast)	D A T S D U H H K O L A Y I L A A Q K T S F	333	дрожжи
SEN3(yeast)	K K L E E N D E G L S A Q I A F D I V S S A S Q Q L L E I V T E L T A Q G Y D P A L N I L S G E P T C D Y	333	дрожжи
55.11(human)	K V P D I Y N T H L E N N R F G G S C S Q V D S . A R H M L A S S F V N G F V N A A F G C D K L L T D D G H K U L Y	391	человек
YHR027c(yeast)	K V P D I Y N T H L E N N R F G G S C S Q V D S . A R H M L A S S F V N G F V N A A F G C D K L L T D D G H K U L Y	391	дрожжи
SEN3(yeast)	Y N T F L L N N K N I D I G L L N K S K S L D G K F S L F H T A V R M A N G E H H A G T T D N S F I K A H . L P N L G	391	дрожжи
55.11(human)	K N E D H C H L A A S L G H I L L M D V D G C L T O I D K Y L	448	человек
YHR027c(yeast)	K N E D H C H L A A S L G H I L L M D V D G C L T O I D K Y L	448	дрожжи
SEN3(yeast)	K A Q N W A K F T A T A S L G V I H K C N E L G K K V H A P T E P G S R A S S R F T T G S E T I G L G L I Y A G F G R	448	дрожжи
55.11(human)	E C D P A L L S D Y V L H N S N T	503	человек
YHR027c(yeast)	E C D P A L L S D Y V L H N S N T	503	дрожжи
SEN3(yeast)	D T T D Y L K N I I V E N S G T S G D E D V D V L L H G A S L G I C A A H G S A H I E V Y A A K E L Y N D S A T S	503	дрожжи
55.11(human)	E V A G V T A L A C G H I A V G S C R G D V T S I L O T I M E K S E T E L H D T Y A R W L P L C L I N H L G K G E A	563	человек
YHR027c(yeast)	E V A G V T A L A C G H I A V G S C R G D V T S I L O T I M E K S E T E L H D T Y A R W L P L C L I N H L G K G E A	563	дрожжи
SEN3(yeast)	G E A A L G H G L C K L G T G K P E A	563	дрожжи
55.11(human)	I E A I A A L E V V S S F R S F A N T L V D V C A Y A G S C H V K V Q Q L L H	605	человек
YHR027c(yeast)	V D D V E T I S A I E H D M T S A I E V L V G S C A Y T C T G D V L H D	605	дрожжи
SEN3(yeast)	A D D L I T K H L A S D E S L L R Y G G A I T I A L A Y A G T G H N S A K R R L H V A V S D S N D D V R R A V I A L	605	дрожжи
55.11(human) E E T A E G O T N S I S D F L G E Q V N E P T K N E A E I E V D H E V D A E G E E V	605	человек
YHR027c(yeast)	G F V L L R D Y T T V P R I V Q L L S K S N A H V R C G T A F A L C T A C A G K G L Q S A I D V L D P L T K D P V E	605	дрожжи
SEN3(yeast)	605	дрожжи
55.11(human) I C S E H F D S E E E E D K D K K E K K D K D K K E A P A H G A H Q G V A V L G	647	человек
YHR027c(yeast)	V K A E I T E X K N G E S L E G E P I K S E E X K G S S D K D A T T D G N D D E E E E K E A C I V D E L A Y A V L G	647	дрожжи
SEN3(yeast)	V R Q A A H I A L S H I L I Q O T E K L N P Q V A D I N E N F L S V I T N H Q E G L A K F G A C V A O G I M N A C G R	647	дрожжи
55.11(human)	I A L I A G E E I C A E N A L R T E G H L R Y C E P T L R R A V P L A L A I S V S N P R L N I L	701	человек
YHR027c(yeast)	I A L I A G E E I C A E N A L R T E G H L R Y C E P T L R R A V P L A L A I S V S N P R L N I L	701	дрожжи
SEN3(yeast)	N V T I Q I A E N A D T G T D T K S V V G L V M S O F W Y M F P L A H F S I S T F T T V I G I R G S D O A I P K F	701	дрожжи
A.thaliana(plant) W X I R S E R V I C V G E Q N I R R A V P L A C L C H S N P K V T V H	701	растение
C.elegans(nematode)	701	нематод
55.11(human)	S H D A D P E V S Y N S I F A N G H V G S C T N N A R L A A M L R O L A C V N A X D D N N L F H V A L A Q G L T H L G E	764	человек
YHR027c(yeast)	S H D A D P E V S Y N S I F A N G H V G S C T N N A R L A A M L R O L A C V N A X D D N N L F H V A L A Q G L T H L G E	764	дрожжи
SEN3(yeast)	Q M N C Y A K E D A F S Y P R M Y E E A S G K E V E K V A T A V	764	дрожжи
A.thaliana(plant)	S H D R F R S C N G S N Y I P W I D R R W N Q Q C D S W H A * K S Q L L L G C D X F R S V C A S L K G X H R G F	764	растение
C.elegans(nematode)	764	нематод
55.11(human)	C T L T L C P Y H S D R Q L M S Q V A V A C L T V L V S F L D V R N I I L C N S H V V L Y C L V N A H O P P I L V T H	824	человек
YHR027c(yeast)	C T L T L C P Y H S D R Q L M S Q V A V A C L T V L V S F L D V R N I I L C N S H V V L Y C L V N A H O P P I L V T H	824	дрожжи
SEN3(yeast)	K E K G P H E E K K R E E E E K E R E T H K K G D K E T K E N D E E F Y A N K Y S S K P Y K V D N H T I I P Q Q	824	дрожжи
A.thaliana(plant)	G L C G L U P E N S I A X P L X N P D F P W V G X N F A Q X X X F I E T	824	растение
C.elegans(nematode)	824	нематод
55.11(human)	D E E L E P L P V S V R V G O A V O V G O A G E P E T I T G F O T H T T P V L L A N G E R A E L A I E L F	878	человек
YHR027c(yeast)	N D E G E P I K V N V R V G O A V O V G O A G R P K K I T G M H Q S T P V L L N H G E R A E L E T D E Y	878	дрожжи
SEN3(yeast)	S R Y I S F I K D D P F V P R K F K G N N G V P L R D R E P F E	878	дрожжи
A.thaliana(plant)	V E E H K P G S L K Q I N V S V P V G G P V D V A O A G E P K T I T G F O T H T T P V L L A N G E R A E L N D E Y	878	растение
C.elegans(nematode)	878	нематод
55.11(human)	I P V T F I L E G F V I F C R T	900	человек
YHR027c(yeast)	I S Y T S H I E G V V I L K E N P D V R E E E	900	дрожжи
SEN3(yeast)	I P T F F K V D D N D F P S A	900	дрожжи
A.thaliana(plant)	I S V T P H L E G L V I L K E P D V O P V V V E T R K 97	900	растение
C.elegans(nematode)	900	нематод

FIGURE 4
Рис. 4

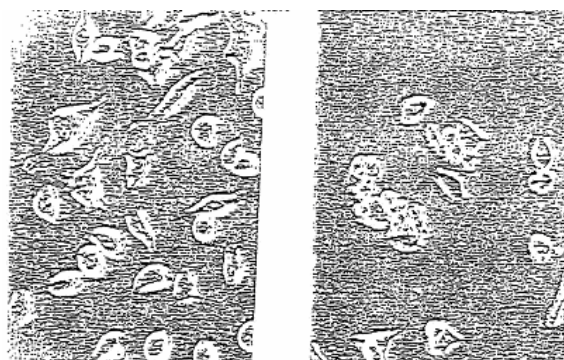


FIGURE 6
Рис. 6

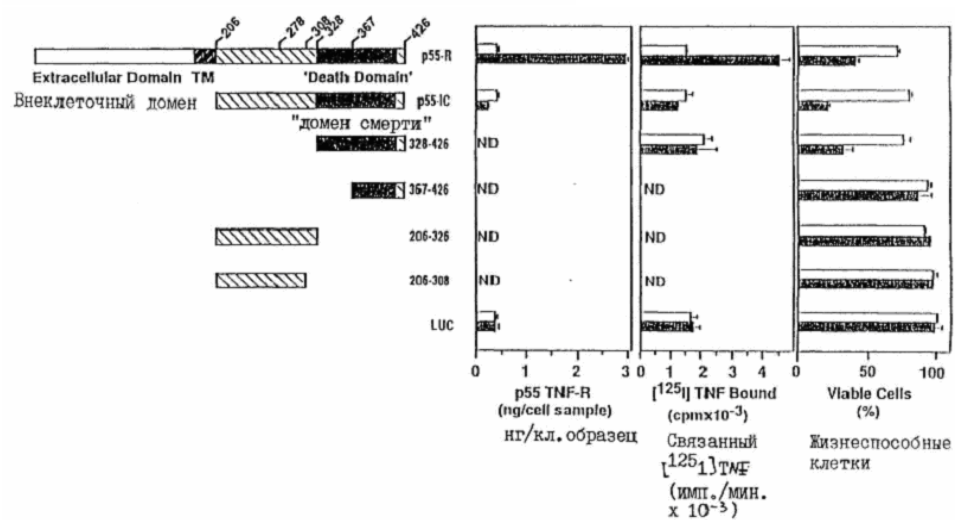


FIGURE 7

[illegible]

FIGURE 9
Рис. 9

