



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



(10) FI 116943 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

13.04.2006

(51) Kv.Ik. - Int.kl.

C07K 14/71 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

944516

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

29.09.1994

(24) Alkuperäpäivä - Löpdag

26.03.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

22.11.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US93/02938

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

30.03.1992 US 860710 P

(73) Haltija - Innehavare

1 • Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Smith, Craig A., 2405 - 5th West, Seattle, WA 98119, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kasvainkuoliotekijän reseptoria sisältävien fuusioproteiinien valmistamiseksi ja niitä koodaava DNA ja vektori
Förfarande för framställning av fusionsproteiner innehållande receptor för tumörnekrosfaktor och DNA och vektor som
kodar för dem

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:

68337 ATCC

68922 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US 5073627 A, WO 91/17184 A,

Nature vol. 343 (1990) nro January 25 p. 341.346, Science vol. 248 (1990) nro May 25 p. 1019-1023, Journal of Experimental Medicine vol. 174 nro 6 (1991) p. 1483-1489

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Fuusioproteiinit sisältävät kasvainkuoliotekijäreseptori (TNF-R) -polypeptidiä ja ainakin yhtä muuta polypeptidiä, joka on interleukiini-1-reseptori (IL-1R) tai toinen TNF-R-polypeptidi. Yksi tällainen fuusioproteiini sisältää yhtä IL-1R-polypeptidiä ja kahta TNF-R-polypeptidiä. Fuusioproteiineilla on terapeuttista käyttöä ja niitä voidaan valmistaa yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

Uppfinningen avser fusionsproteiner, vilka omfattar en tumörnekrosfaktorreceptor (TNF-R)-polypeptid och åtminstone en ytterligare peptid, vald bland en interleukin-1-receptor (IL-1R) och en andra TNF-R-polypeptid. Ett sådant fusionsprotein omfattar en IL-1R- och två TNF-R-polypeptider. Fusionsproteinerna har terapeutisk användning och kan framställas via rekombinant DNA-teknologi.

Menetelmä kasvainkuoliotekijän reseptoria sisältävien fuusioproteiinien valmistamiseksi ja niitä koodaava DNA ja vektori

5 **Keksinnön tausta**

Useiden sytokiinien tiedetään sitoutuvan kohdesolujen pinnalla oleviin spesifisiin reseptoriproteiineihin. Tunnistettuihin spesifisiin reseptoriproteiineihin kuuluu kasvainkuoliotekijäreseptoreita ja interleukiini-1-reseptoreita. Parhaillaan ollaan kohdistamassa runsaasti voimavaroja useiden reseptorien eristämiseen ja luonnehtimiseen näiden fysiologisten tehtävien tutkimiseksi ja mahdollisten terapeuttisten käyttömuotojen selvittelemiseksi. Sillä, että potilaalle annettu liukoinen reseptori sitoo tiettyä nimenomaista molekyyliä, johon sen vaikutus kohdistuu, voi olla mahdollista lievittää sairauksia, joissa kohteena olevalla molekyylillä on osuutta.

Kasvainkuoliotekijä- α (TNF α , josta käytetään myös nimitystä kakektiini) ja kasvainkuoliotekijä- β (TNF β , josta käytetään myös nimitystä lymfotoksiini) ovat nisäkkäiden endogeenisiä erittyviä homologisia proteiineja, jotka kykenevät käynnistämään hyvin monenlaisia toimintoja lukuisissa solutyypeissä. Näiden kahden sytokiinin rakenteellisten ja toiminnallisten ominaisuuksien suuren yhdenmukaisuuden johdosta niistä on käytetty yhteisnimitystä "TNF". On eristetty komplementaarisia cDNA-klooneja, jotka koodaavat TNF α :aa [Pennica, et al., Nature 312 (1984) 724] sekä TNF β :aa [Gray, et al., Nature 312 (1984) 721] ja jotka ovat tehneet mahdollisiksi TNF:n rakennetta ja biologisia ominaisuuksia koskevat jatkotutkimukset.

TNF-proteiinien biologinen vaikutus soluihin käynnistyy niiden sitoutumisesta spesifisiin TNF:n reseptoriproteiineihin (TNF-R-proteiinit), jotka ilmentyvät TNF:ään reagoivan solun plasmamembraanin pinnalla. Ensimmäinen näyttö TNF α :n ja TNF β :n sitoutumisesta solujen pinnalla olevaan yhteiseen reseptoriin saatiin käyttämällä kohdun-

kaulankarsinoomahumaanisolulinjaa ME-180 [Aggarwal, et al.,
 Nature 318 (1985) 665]. Hohmann, et al. [J. Biol. Chem. 264
 (1989) 14927] ovat julkaisseet tutkimusraportin, jonka
 5 mukaan eri solutyypeissä on olemassa ainakin kaksi erilais-
 ta solun pinnalla olevaa TNF:n reseptoria, vaikkakin näiden
 TNF-R-molekyylien välinen suhde on epäselvä. Näiden resep-
 torien näennäinen suhteellinen moolimassa on noin 75 - 80
 kDa ja noin 55 - 60 kDa, vastaavassa järjestyksessä ilmoit-
 tettuina. Solun pinnalla olevien TNF-reseptorien lisäksi on
 10 myös ihmisen virtsasta tunnistettu liukoisia proteiineja,
 jotka kykenevät sitomaan TNF:ää [Peetre, et al., Eur. J.
 Haematol. 41 (1988) 414; Seckinger, et al., J. Exp. Med.
 167 (1988) 1511; Seckinger, et al., J. Biol. Chem. 264
 (1989) 11966; Seckinger, et al., GB-patenttihakemusjulkaisu
 15 nro 2 218 101; Engelmann, et al., J. Biol. Chem. 264 (1989)
 11974].

Interleukiini-1 α (IL-1 α) ja interleukiini-1 β
 (IL-1 β) ovat kaukaisesti toisiaan muistuttavia polypeptidi-
 hormoneja, joilla on keskeinen osuus immuuni- ja tuleh-
 20 dusvasteiden säätelyssä. Nämä kaksi proteiinia vaikuttavat
 useisiin erilaisiin solutyyppeihin ja niillä on useita
 biologisia aktiivisuuksia. Niissä biologisissa aktiivisuuksis-
 ssa, joiden on katsottava johtuvan IL-1 α :sta ja
 IL-1 β :sta, välittyvät vaikutukset ainakin kahden sellaisen
 25 plasmamembraaniin sitoutuneen reseptorin välityksellä, jot-
 ka sitovat sekä IL-1 α :aa että IL-1 β :aa. B-soluissa ilmen-
 tyvät IL-1:n reseptorit (näistä käytetään tässä keksinnössä
 nimitystä IL-1:n tyyppin II reseptorit) ovat erilaisia kuin
 T-solujen ja muiden solutyyppeiden pinnalla ilmentyvät IL-1:n
 30 reseptorit (näistä käytetään tässä keksinnössä nimitystä
 IL-1:n tyyppin I reseptorit).

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö kohdistuu DNA:han, joka koodaa resep-
 toreita, jotka sisältävät ensimmäistä kasvainkuoliotekijä-
 35 reseptori (TNF-R)-polypeptidiä, joka on liitetty kovalent-
 tisesti toiseen TNF-R-polypeptidiin. Reseptori voi sisältää

kahta TNF-R-polypeptidiä, jotka on liitetty kovalenttisesti yhteen tai kahteen interleukiini-1-reseptori (IL-1R) -polypeptidiin.

5 Reseptorit valmistetaan edullisesti fuusioproteiineina yhdistelmä-DNA-menetelmiä käyttäen. Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön fuusioproteiineja, jotka sisältävät kahta biologisesti aktiivista polypeptidikomponenttia TNF-R-polypeptidiä. Keksinnön mukainen fuusioproteiini sisältää kahta TNF-R-polypeptidiä, jotka ovat peptidikytkijäjakson yhdis-
10 tämät.

Toisessa tämän keksinnön sovellutusmuodossa fuusioproteiini sisältää TNF-R:ää ja IL-1R:ää. Fuusioproteiini sisältää edullisesti kahta TNF-R-polypeptidiä ja joko yhtä tai kahta IL-1R-polypeptidiä.

15 Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön näitä fuusioproteiineja koodaavia eristettyjä DNA-jaksoja, tällaisia DNA-jaksoja sisältäviä yhdistelmä-ilmentämisvektoreita, näitä ilmentämisvektoreita sisältäviä isäntäsoluja ja menetelmiä yhdistelmä-fuusioproteiinien valmistamiseksi näitä
20 isäntäsoluja viljelemällä. Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät edellä esitetyn kuvauksen mukaista puhdistettua fuusioproteiinia ja sopivaa laimenninta, kantaja-ainetta tai lisäainetta. Tällaiset koostumukset ovat käyttökelpoisia kasvainkuoliotekijän tai interleukiini-1:n välityksellä tapahtuvien sairauksien hoidossa, diagnoosissa ja määrityksissä.

Keksinnön mukaiselle DNA:lle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Keksinnön mukaiselle ilmentymisvektorille on tunnusomaista, että se sisältää kyseistä DNA:ta. Keksinnön mukaiselle menetelmälle fuusioproteiinien valmistamiseksi tai sitä sisältävän farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi on tunnusomaista se,
30 mitä patenttivaatimuksessa 7 tai 8 esitetään.

Piirrosten pääpiirteittäinen selitys

Kuvio 1 on tyyppin I humaani-IL-1R:n cDNA-kloonin restriktiokartta. Kuviossa on esitetty kohdat, joista tiettyt restriktioentsyymit pilkkovat cDNA:ta.

5 Kuvioissa 2A - 2B on esitetty yhden humaani-TNF-R-kloonin osittainen cDNA-jakso ja siitä päätelty aminohappojakso. Nukleotidit on numeroitu translaatioon osallistumattoman 5'-puoleisen alueen alusta lähtien. Aminohapot on numeroitu signaalipeptidijakson alusta lähtien. Selvästi
10 tunnistettavaa signaalipeptidijaksoa edustavat aminohapot -22 - -1. Asemassa 1 oleva kypsän TNF-R-proteiinin N-terminaalinen leusiini on alleviivattu. Aminohappojen 236 - 265 alueelta peräisin oleva selvästi tunnistettava transmembraanialue on myös alleviivattu. Useiden erilaisten liu-
15 koisten TNF-R-molekyylien C-terminaaliset päät on merkitty nuolella (∇). Kuviossa on myös esitetty ilmentämisvektorien konstruoimiseen käytettyjen tiettyjen restriktioendonukleaasien katkaisukohdat.

20 Kuvio 3 esittää plasmidivektoria, joka sisältää sellaista fuusioproteiinia koodaavaa DNA-fragmenttia, jolla on kaava TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R ja joka on konstruoitu esimerkissä 11 kuvatulla tavalla.

25 Kuvio 4 esittää plasmidivektoria, joka sisältää sellaista fuusioproteiinia koodaavaa DNA-fragmenttia, jolla on kaava IL-1R-kytkijäjakso-TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R ja joka on konstruoitu esimerkissä 12 kuvatulla tavalla.

30 Kuvio 5 esittää kolmea plasmidivektoria, jotka ovat tiettyjen tämän keksinnön mukaisten vektorien, jotka on kuvattu esimerkissä 12, konstruoimisessa olevia välituotteita.

Keksinnön yksityiskohtainen selitys

35 Tässä kuvataan reseptoreita, jotka sisältävät ensimmäistä TNF-R-polypeptidiä, joka on liitetty kovalenttisesti toiseen TNF-R-polypeptidiin. Reseptori sisältää kahta TNF-R-polypeptidiä, jotka on liitetty kovalenttisesti yhteen tai kahteen IL-1R-polypeptidiin. TNF-R-polypeptidi-

komponentit ja IL-1R-polypeptidikomponentit (milloin niitä on käytetty) voivat olla liitetyt toisiinsa millä tahansa menetelmällä yhden polypeptidin liittämiseksi toiseen. Kytkemismenetelmiin, joiden käyttö voi tulla kysymykseen, kuuluvat silloitusreagenssien ja peptidikytkijäjaksojen käyttö. TNF-R- ja IL-1R-polypeptidit ovat peräisin nisäkäslajeista ja ne ovat edullisesti peräisin ihmisestä.

Reseptorit on edullista valmistaa fuusioproteiineina yhdistelmä-DNA-menetelmiä käyttäen. Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön fuusioproteiineja, jotka sisältävät nisäkkäiden kasvainkuoliotekijäreseptoria (TNF-R). Tämän keksinnön mukainen fuusioproteiini sisältää kahta TNF-R-polypeptidiä ja se voidaan esittää kaavalla:

15 TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R

jossa kytkijäjakso on peptidikytkijäjakso.

Toisessa tämän keksinnön sovellutusmuodossa fuusioproteiini sisältää TNF-R:ää ja nisäkkäiden interleukiini-1-reseptoria (IL-1R:ää). Tässä tämän keksinnön sovellutusmuodossa fuusioproteiini voi sisältää TNF-R-polypeptidiä ja yhtä IL-1R-polypeptidiä. On edullista, että fuusioproteiinin muodostamiseksi liitetään toisiinsa kaksi TNF-R-polypeptidiä ja yksi IL-1R-polypeptidi. Nämä kaksi TNF-R-polypeptidiä ovat TNF:n sitoutumisen edistämiseksi peräkkäin (vastakohtana sille, että IL-1R olisi sijoitettu kahden TNF-R-molekyylin väliin). Esimerkkejä tällaisista fuusioproteiineista ovat proteiinit, joita edustavat kaavat:

30 TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R-kytkijäjakso-IL-1R ja
IL-1R-kytkijäjakso-TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R

jossa kukin kytkijäjakso on peptidikytkijäjakso. Kunkin fuusioproteiinin N-terminaalinen pää on kunkin kaavan vasemmalla puolella.

Näiden fuusioproteiinien kukin TNF-R-polypeptidi-komponentti kykenee sitomaan itsenäisesti kasvainkuolio-tekijää (TNF). Samoin kukin näissä fuusioproteiineissa käytetty IL-1R-polypeptidi kykenee sitomaan itsenäisesti interleukiini-1:tä (IL-1:tä). Kahden peräkkäisen TNF-R-polypeptidin käyttö fuusioproteiinissa on edullista siinä mielessä, että tämä lisää TNF:n sitoutumisaffiniteettia verrattuna yhden TNF-R-polypeptidin aikaansaamaan TNF:n sitoutumiseen.

Sellaiset peptidikytkijäjaksot, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä, pitävät TNF-R-polypeptidejä (sekä IL-1R-polypeptidejä, milloin nämä ovat käytössä) sellaisen riittävän suuruisen etäisyyden päässä toisistaan, että tämä varmistaa kunkin polypeptidin laskostumisen asiaankuuluvalla tavalla halutulle biologiselle aktiivisuudelle välttämättömiin sekundäärisiin ja tertiäärisiin rakenteisiin. Kytkijäjaksot on myös annettava TNF-R- ja IL-1R-polypeptidien ekstrasellulaarisille domeeneille mahdollisuus asettua asiaankuuluvaan avaruudelliseen orientaatioon TNF:n tai IL-1:n sitoutumiskohdan muodostamiseksi. Nämä peptidikytkijäjaksot toimivat loitontavina osina, joiden vastakohtana ovat fuusioproteiinien farmaseuttisesti aktiiviset TNF-R- ja IL-1R-polypeptidikomponentit. Sopivat peptidikytkijäjaksot asettuvat edullisesti (1) joustavaan oienneeseen konformaatioon, (2) niillä ei ole taipumusta kehittää järjestynyttä sekundäärirakennetta, joka saattaisi häiritä proteiinien funktionaalisia domeeneja, ja (3) niillä on mahdollisimman vähän sellaisia hydrofobisia tai varauksellisia ominaisuuksia, jotka saattaisivat edistää vuorovaikutusta proteiinien funktionaalisten domeenien kanssa. Tyypillisiin proteiinien pinnalle sijoittuviin aminohappoihin proteiinien joustavissa alueissa kuuluvat glysiini (Gly), asparagiini (Asn) ja seriini (Ser). Käytännöllisesti katsoen kaikkien Gly:tä, Asn:ää ja Ser:ää sisältävien aminohappojaksopermutaatioiden voitaisiin odottaa olevan edellä olevan peptidikytkijäjaksot periaatteiden mukaisia.

Kytkejäyksissä voidaan myös käyttää muita lähes neutraaleja aminohappoja, kuten treoniinia (Thr) ja alaniinia (Ala). Sopivat peptidikytkijäyksöt sisältävät tavallisesti aminohappoketjun, jonka pituus on edullisesti 5 - 100 aminohappoa ja edullisimmin 10 - 20 aminohappoa. Esimerkkejä tällaisista kytkijäyksöistä ovat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, jossa n on 1 - 12, $\text{Gly}_4\text{SerGly}_5\text{Ser}$ ja $(\text{Gly}_4\text{SerGly}_5\text{Ser})_2$.

TNF-R- ja IL-1R-polypeptidit

10 Tässä keksinnössä termit "interleukiini-1-reseptori" ja "IL-1R" tarkoittavat proteiineja, jotka kykenevät sitomaan interleukiini-1 (IL-1) -molekyylejä ja niiden tehtävänä natiivissa konfiguraatiossaan humaaniplasmamembraaniproteiineina on välittää IL-1:n antama signaali soluun.

15 Tässä keksinnössä termit "TNF-reseptori" ja "TNF-R" tarkoittavat proteiineja, jotka ovat biologisesti aktiivisia siinä mielessä, että ne kykenevät sitomaan kasvainkuoliotekijää (TNF). Näiden proteiinien natiivit membraaniin sitoutuneet muodot välittävät samalla tavoin soluun TNF-molekyylin sitoutumisesta alkunsa saaneen biologisen signaalin.

20 TNF-R-polypeptidit voivat olla identtisiä tai erilaisia. Tämä sama pitää paikkansa IL-1R-polypeptidien kyseessä ollessa.

Täydellisiin reseptoreihin kuuluu tavallisesti ligandiin sitoutuva solunulkoinen domeeni, hydrofobinen transmembraanidomeeni, joka pysyy plasmamembraanin lipidikaksoiskerroksessa, ja sytoplasmisen eli solunsisäinen domeeni, jonka arvellaan tuovan biologisen signaalin efektorisoluihin solun sytoplasmassa tapahtuvien peräkkäisten kemiallisten reaktioiden välityksellä. Hydrofobinen transmembraanidomeeni ja transmembraanidomeenista välittömästi myötäsuntaan oleva sytoplasmisen domeenin voimakkaasti varautunut alue toimivat yhdessä siten, että ne pysäyttävät IL-1:n ja TNF:n reseptorien kuljetuksen plasmamembraanin läpi.

30 Tässä keksinnössä selitettyjen TNF-R- ja IL-1R-proteiinien solunulkoinen domeeni on proteiinin N-termi-

35

naalinen osa, joka alkaa aminohaposta 1 ja päättyy transmembraanialuetta välittömästi edeltävään aminohappoon. Sytoplasminen domeeni on transmembraanialueesta myötäsuntaan oleva osa proteiinia.

5 Niihin TNF-R-polypeptideihin, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten fuusioproteiinien komponentteina, kuuluu polypeptidi, joka sisältää kuvioissa 2A - 2B esitetyn jakson aminohapot 1 - 439, joka on täysimittaisen natiivin TNF-R:n jakso. Nämä TNF-R:n DNA- ja aminohappo-
10 jaksot on myös esitetty jaksotunnisteissa nro 1 ja 2. Haluttaessa käyttää signaalijaksoa voi TNF-R-polypeptidi myös sisältää kuvioiden 2A - 2B mukaisen jakson aminohapot -22 - 439. Se, että molekyylissä halutaan käyttää signaalijaksoa, on riippuvainen sellaisista tekijöistä, kuten TNF-R-poly-
15 peptidin asema fuusioproteiinissa sekä nisäkkäiden signaalijakson mahdollinen muokkautuminen aiotuissa isäntäsoluissa, mitä on tarkasteltu tuonnempana. Tämän humaani-TNF-R:n kypsä täysimittainen natiivi glykosyloitunut muoto on glykoproteiini, jonka suhteellinen moolimassa on noin 80 kilo-
20 daltonia (kDa). Tässä patenttiselityksessä tarkoittaa termi "kypsä" proteiinia, jossa ei ole sitä johto- eli signaalijaksoa, jollainen voi esiintyä natiivin geenin täysimittaisissa transkriptiotuotteissa. Proteiini voi sisältää signaalijakson heti ilmentämisen jälkeen. Proteiinin kypsän muodon synnyttää signaalijakson pilkkoutuminen proteiinin erittyessä solusta.

Muita sopivia TNF-R-polypeptidejä on kuvattu EP-patenttihakemusjulkaisussa nro 422 339 (tästä käytetään tuonnempana nimitystä EP-422 339), joka on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten
30 nojalla. Kaksi sopivaa TNF-R-polypeptidiä sisältävät ryhmänä 174 arginiinin (Arg), mutta ne ovat muutoin identtiset edellä kuvattujen polypeptidien suhteen, jotka sisältävät tämän patenttihakemusjulkaisun kuvioiden 2A - 2B mukaiset aminohapot 1 - 439 tai -22 - 439, vastaavassa järjestyksessä ilmoitettuna. TNF-R:n aminohappojakso, joka on ident-
35

5 tinen (tämän keksinnön mukaisten) kuvioiden 2A - 2B mukai-
 sen aminohappojakson suhteen, lukuunottamatta sitä, että
 kypsän jakson asemassa 174 olevan metioniinin (Met) tilalla
 on arginiini (Arg), on kuvattu julkaisussa EP-422 339 (tätä
 on käsitelty kyseisessä julkaisussa olevassa kuviossa 39).

10 Julkaisun EP-422 339 kuviossa 21 on kuvattu toisen
 käyttökelpoisen TNF-R-polyeptidin cDNA-jakso ja tämän koo-
 daama aminohappojakso. Julkaisun EP-422 339 kuvion 21 mu-
 kaisen cDNA-jakson koodaava alue ja tämän koodaama amino-
 happojakso on esitetty tämän patenttihakemuksen jaksotun-
 nisteena nro 3 ja 4. Vaikkakin julkaisussa EP-422 339 tästä
 15 proteiinista on käytetty nimitystä 30 kilodaltonin protei-
 iini, niin sen suhteelliseksi moolimassoiksi on raportoitu
 muunlaisia suhteellisia moolimassoja. Esimerkiksi julkai-
 sussa Loetscher, et al. [Cell 61 (1990) 351] ja julkaisussa
 EP-417 563 on suhteellisen moolimassan raportoitu olevan
 20 noin 55 kilodaltonia. Käyttökelpoisiin TNF-R-polyeptidei-
 hin sisältyvät polypeptidit, jotka sisältävät jaksotunnis-
 teen nro 4 mukaisen jakson aminohapot 1 - 415, tai halut-
 taessa käyttää signaalijaksoa, jaksotunnisteiden nro 4 mukai-
 sen jakson aminohapot -40 - 415. Menetelmiä tämän TNF-R-
 proteiinin valmistamiseksi joko puhdistamalla se virtsasta
 tai U937-soluviljelmän kasvatusmediumista tai käyttämällä
 yhdistelmä-DNA-menetelmiä, on kuvattu julkaisussa EP-
 25 422 339. Tälle TNF-R:lle on tunnusomaista N-terminaalinen
 jakso (proteiinin kypsää muotoa vastaava jakso), joka on
 Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-, kun taas kuvioiden 2A - 2C mukai-
 sen TNF-R-proteiinin kypsän muodon N-terminaalinen jakso on
 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-.

30 Tietyissä tämän keksinnön sovellutusmuodoissa TNF-
 R-polyeptidi on liukoinen TNF-R-polyeptidi. Liukoisista
 TNF-R-polyeptideistä puuttuu ainakin osa siitä transmem-
 braanialueesta, joka edistää proteiinin pysymistä solun
 pinnalla (kyseinen alue puuttuu edullisesti kokonaan). Liu-
 35 koisista polypeptideistä puuttuu tavallisesti myös syto-
 plasmisen domeenin varauksia sisältävä alue (tämä sijaitsee

heti transmembraanialueen jälkeen myötäsuntaan), joka myötävaikuttaa molekyylin pysymiseen solun pinnalla. On edullista, että proteiinista on poistettu koko transmembraanialue ja sytoplasminen alue tai että ne on korvattu hydrofiilisillä aminohapoilla liukoisen TNF-R:n muodostamiseksi. Liukoinen TNF-R erittyy solusta ja säilyttää halutun biologisen aktiivisuuden.

Esimerkkejä liukoisista TNF-R-polypeptideistä ovat polypeptidit, jotka sisältävät kuvion 2A mukaisen jakson aminohapot 1 - x, jossa x on C-terminaalinen aminohappo ja se on mikä tahansa kuvion 2A mukaisista aminohapoista 163 - 235. Erityisiin esimerkkeihin sisältyvät polypeptidit, jotka sisältävät kuvion 2A mukaiset hapot 1 - 163, 1 - 185 tai 1 - 235. Liukoinen TNF-R-polypeptidi voi lisäksi sisältää signaalijakson, esimerkiksi kuvion 2A mukaiset aminohapot -22 - 1.

Muita esimerkkejä liukoisista TNF-R-polypeptideistä ovat polypeptidit, jotka sisältävät kuvioiden 2A - 2B mukaisen jakson aminohapot 1 - 184 tai 1 - 182, -22 - 184 tai -22 - 182. Nämä proteiinit voivat sisältää asemassa 174 joko metioniinin tai arginiinin. Menetelmiin tällaisia TNF-R-polypeptidejä edustavien esimerkkien valmistamiseksi sisältyvät menetelmät, jotka on kuvattu julkaisun EP-422 339 esimerkeissä 17 ja 22.

Jaksotunnisteessa nro 4 esitetty TNF-R-proteiini sisältää signaalipeptidin (tätä esittävät aminohapot -40 - -1) ja asemassa 172 olevasta valiinista alkavan transmembraanialueen. Tämän TNF-R-proteiinin edullisiin liukoisiin muotoihin kuuluvat muodot, jotka käsittävät jaksotunnisteen nro 4 mukaiset aminohapot -40 - w tai 1 - w, jossa w on alueelta 161 - 171 oleva kokonaisluku (toisin sanoen C-terminaalinen pää on mikä tahansa jaksotunnisteen nro 4 mukaisista aminohapoista 161 - 171). Julkaisun EP-422 339 esimerkissä 7 on kuvattu in vitro -olosuhteissa suoritettavan oligonukleotidikohdemutageneesin käyttöä sellaisen ilmentämisvektorin konstruomiseksi, joka koodaa biologisesti ak-

tiivista TNF-R-proteiinia, jonka C-terminaalisisena aminohappona on aminohappo 161 (asparagiini). Lisäksi menetelmiä kummankin edellä kuvatun TNF-R-proteiinin luonnossa esiintyvien liukoisten muotojen (toisin sanoen jaksotunnisteen nro 2 ja jaksotunnisteen nro 4 mukaisten proteiinien liukoisten muotojen) puhdistamiseksi humaanivirtsasta on kuvattu julkaisussa Engelmann, et al. [J. Biol. Chem. 265 (1990) 1531].

Interleukiini-1-reseptoreihin, joita voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten fuusioproteiinien komponentteina, kuuluvat polypeptidit, joista on tässä keksinnössä käytetty merkintöjä tyyppin I IL-1R ja tyyppin II IL-1R. Tyyppin I IL-1-reseptoreita on havaittu T-solujen ja tiettyjen muiden solutyyppeiden pinnalla, kun taas on olemassa tutkimusraportteja tyyppin II IL-1-reseptoreiden ilmentymisestä B-solujen pinnalla. Silloin kun mitään erikoismerkintää ei ole käytetty, tarkoittaa termi "IL-1-reseptori" tässä keksinnössä yhteisesti tyyppin I ja tyyppin II IL-1-reseptoreita.

Niihin IL-1R-polypeptideihin, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä, kuuluvat tyyppin I IL-1R-polypeptidit, joita on kuvattu 14.1.1992 jätetyssä US-patenttihakemusjulkaisussa nro 07/821 716; ja 21.12.1989 jätetyssä US-patenttihakemusjulkaisussa nro 455 488; ja EP-patenttihakemusjulkaisussa nro 318 296; joiden patenttiselitykset on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Tyyppin I IL-1R-humaaniproteiinia koodaava kloonatun cDNA:n DNA-jakso ja tämän koodaama aminohappojakso on esitetty tässä keksinnössä jaksotunnisteissa nro 5 ja 6. Tämä proteiini sisältää 569 aminohappoa, joista 20 muodostaa N-terminaalisen signaalipeptidin. Asemassa 1 oleva asparagiinihappo (Asp) -ryhmä on kypsän proteiinin ensimmäinen aminohappo. Transmembraanialue sisältää aminohapot 317 (His) - 336 (Tyr). Humaanii-IL-1R:n jakso on myös kuvattu julkaisussa Sims, et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 8946.

Aivan kuten TNF-R-polyeptidien suhteen oli asianlaita, voidaan tässä keksinnössä fuusioproteiineissa käyttää liukoisia IL-1R-polyeptidejä. Liukoisista IL-1R-polyeptideistä puuttuu tavallisesti transmembraanialue ja niistä puuttuu myös edullisesti sytoplasmisen domeeni. Liukoiset IL-1R-proteiinit voivat myös sisältää osan transmembraanialuetta tai sytoplasmista domeenia, edellyttäen, että liukoinen IL-1R-proteiini kykenee erittymään solusta.

Esimerkkeihin liukoisista tyyppin I IL-1R-polyeptideistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, polypeptidit, jotka sisältävät aminohappojakson, jota voidaan kuvata jaksotunnisteen nro 6 aminohapoilla $y - x$, jossa x on 312 - 316 ja y on -3 - 3. Toisin sanoen N-terminaalinen aminohappo on asemassa -3, -2, -1, 1, 2 tai 3 oleva Leu-, Glu-, Ala-, Asp-, Lys- tai Cys-ryhmä, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Liukoisen proteiinin C-terminaalinen aminohappo on asemassa 312, 313, 314, 315 tai 316 oleva Thr-, Asn-, Phe-, Gln- tai Lys-ryhmä, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Edullisiin liukoisiin IL-1R-polyeptideihin kuuluvat ne polypeptidit, jotka sisältävät jaksotunnisteen nro 6 aminohapot $1 - x$, jossa x on 312 - 316.

Mitkä tahansa edellä kuvatuista liukoisista tyyppin I IL-1R-polyeptideistä voivat lisäksi sisältää signaalijakson, toisin sanoen jaksotunnisteessa numero 6 aminohappoina -20 - -1 esitetyn signaalijakson. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää aiotussa isäntäsolussa toimintakykyistä erilaista signaalijaksoa (esimerkiksi hiivan signaalijaksoa) tuonnempana tarkasteltavalla tavalla.

Niitä tyyppin II IL-1R-polyeptidejä, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat polypeptidit, joita on kuvattu 16.6.1991 jätetyssä US-patenttihakemusjulkaisussa nro 701 415; ja EP-patenttihakemusjulkaisussa nro 460 846; joiden patenttiselitykset on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Solulyysaateista talteen otettujen natiivien glykosyloituneiden

tyypin II IL-1R-humaaniproteiinien näennäinen suhteellinen moolimassa on SDS-PAGE:lla määritettynä noin tavallisesti 60 - 68 kilodaltonia. Jaksotunnisteissa nro 7 ja 8 on esitetty tyypin II IL-1R-humaaniproteiinia koodaavan kloonatun cDNA:n DNA-jakso ja tämän koodaama aminohappojakso. Tämä proteiini sisältää 13-aminohappoisen signaalipeptidin. Transmembraanialue sisältää aminohapot 331 (Ala) - 356 (Met).

Liukoiset tyypin II IL-1R-proteiinit muodostetaan deletoimalla proteiinin C-terminaalinen osa, joka ei ole välttämätön IL-1:n sitoutumiselle, niin että proteiini erittyy solusta. Asemassa 313 olevan kysteiiniryhmän arvelaan olevan välttämätön tyypin II IL-1R-molekyylin tertiäärin rakenteen säilymiselle sekä sille, että molekyyli kykenee sitomaan IL-1:tä. Esimerkkeihin liukoisista tyypin II IL-1R-polypeptidistä sisältyvät siten polypeptidit, joissa C-terminaalinen aminohappo on mikä tahansa aminohapoista 314 - 333. Toisin sanoen liukoinen IL-1R voi sisältää jaksotunnisteessa nro 8 aminohappoina 1 - x esitetyn aminohappojakson, jossa x on alueelta 314 - 333 oleva kokonaisluku. Edullisiin esimerkkeihin sopivista liukoisista tyypin II IL-1R-polypeptideistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, polypeptidit, jotka sisältävät jaksotunnisteen nro 8 aminohapot 1 - x, jossa x on 330 - 333. Toisin sanoen liukoisen proteiinin C-terminaalinen aminohappo on asemassa 330, 331, 332 tai 333 oleva Glu-, Ala-, Ser- tai Ser-ryhmä, vastaavassa järjestyksessä ilmoitettuna. Liukoiset tyypin II IL-1R-polypeptidit voivat lisäksi sisältää signaalijakson, esimerkiksi aminohappoina -13 - -1 jaksotunnisteessa numero 8 esitetyn signaalijakson. Tuonnempana kuvattavalla tavalla voidaan vaihtoehtoisesti käyttää erilaista signaalijaksoa (esimerkiksi hiivan signaalijaksoa), joka on toimintakykyinen käytettäväksi aiotussa isäntäsolussa.

Tässä keksinnössä kuvattuja määrittämenetelmiä voidaan tässä keksinnössä esitettyjen tiettyjen nimenomaisten

esimerkkien lisäksi käyttää vielä muiden liukoisten TNF-R- ja IL-1R-polyeptidien biologisen aktiivisuuden varmistamiseksi. Liukoinen TNF-R ja liukoinen IL-1R voidaan tunnistaa (ja erottaa muista liukenemattomista membraaniin sitoutuneista vastaineistaan) erottamalla haluttua proteiinia ilmentävät kokonaiset solut soluviljelymediumista, esimerkiksi sentrifugoimalla, ja määrittämällä halutun proteiinin esiintyminen mediumista (supernatantista). Määrittäminen soluviljelymediumista voidaan tehdä käyttäen menetelmiä, jotka muistuttavat tuonnempana olevissa esimerkeissä kuvattuja menetelmiä tai jotka ovat näiden suhteen identtiset. TNF-R:n ja IL-1R:n esiintyminen mediumissa viittaa siihen, että proteiini erittyy soluista ja on siten halutun proteiinin liukoinen muoto.

TNF-R- tai IL-1R-polyeptidien N- tai C-terminaaliossa päässä voi esiintyä vaihtelua sellaisten tekijöiden mukaan, kuten fuusioproteiinia yhdistelmä-DNA-menetelmien avulla valmistettaessa käytetty isäntäsolutyyppejä sekä ne tietyt nimettömät solut, joista proteiini puhdistetaan, silloin kun kyseessä ovat TNF-R tai IL-1R, joita ei ole tuotettu yhdistelmä-DNA-menetelmillä. Tällaisen vaihtelun voidaan esimerkiksi katsoa johtuvan erilaisesta proteiinin translaation jälkeisestä muokkautumisesta erityyppisissä soluissa. N- tai C-terminaalisen jakson vaihtelut voivat myös johtua niistä oligonukleotideista, jotka ilmentämisvektoreita konstruoitaessa on valittu TNF-R:ää tai IL-1R:ää koodaavan DNA-jakson jomman kumman tai molempien terminaaliosien päiden rekonstruoimiseksi.

Muokkauksessa esiintyvät eroavuudet voivat johtaa sellaisten kypsien TNF-R- tai IL-1R-proteiinien muodostumiseen, joissa on jokin muu N-terminaalinen aminohappo kuin jaksojakkien nro 2, 4, 6 ja 8 asemassa 1 esitetty aminohappo. Translaation jälkeinen muokkautuminen poistaa esimerkiksi tietyissä isäntäsoluissa aloituskodonin koodaavan metioniiniryhmän, kun taas metioniiniryhmä säilyy muissa isäntäsoluissa tuotettujen proteiinien N-termi-

naalisessa päässä. On lisäksi tunnettua, että saman proteiinin kyseessä ollessa N- ja C-terminaalisten päissä esiintyy proteiinilähtömateriaalin mukaista vaihtelua. Joissakin tapauksissa voi proteiinin jommassa kummassa terminaalissa 5 päässä olevan aminohapon deleetio johtua proteooyysistä, joka tapahtuu joko solunsisäisesti tai puhdistuksen aikana. Vaihtelevat N-terminaaliset päät voivat myös olla tulosta signaalipeptidin pilkkoutumisesta tietyissä isäntäsoluissa jostakin muusta kohdasta kuin kuvattujen jaksojen 10 aminohappojen -1 ja 1 välistä.

Kuten julkaisun EP-422 339 esimerkeissä 10 ja 11 sekä kuviossa 31 on kuvattu, puuttui humaanivirtsasta puhdistetusta kypsästä TNF-R-proteiinista, jonka muodostamiseen ei ollut käytetty yhdistelmä-DNA-menetelmiä, kaksi N-terminaalista aminohappoa, jotka esiintyivät humaanimonosyyttityyppisestä solulinjasta U937 puhdistetussa TNF-R-proteiinissa, jota ei oltu valmistettu yhdistelmä-DNA-menetelmillä. Virtsasta peräisin olevan TNF-R:n N-terminaalinen aminohappo oli jaksotunnisteen numero 1 asemassa 3 20 oleva alaniiniryhmä. Julkaisussa Engelmann, et al. [J. Biol. Chem. 265 (1990) 1531], on kuvattu TNF:ää sitova proteiini, joka oli puhdistettu ihmisen virtsasta N-terminaalisisestä päästä eriasteisesti tyypistyneissä muodoissa (tätä on käsitelty tiivistelmässä ja sivulla 1 533). Yhden 25 proteiinityypin N-terminaalisen pään aminohappojakso oli Val-Ala-Phe-Thr-Pro, joka vastaa jaksotunnisteen nro 1 mukaisia aminohappoja 5 - 9. Proteiinin muissa muodoissa oli N-terminaalisisena aminohappona joko fenyylialaniini (jaksotunnisteen nro 1 mukainen aminohappo 7) tai treoniini (jaksotunnisteen nro 1 mukainen aminohappo 8).

TNF-R- ja IL-1R-proteiinien N- ja C-terminaalisisissa 30 päissä voi esiintyä sellaisista syistä johtuvaa vaihtelua, joihin sisältyvät edellä tarkastellut syyt. N-terminaalinen aminohappo voi esimerkiksi olla mikä tahansa TNF-R:n kyseessä ollessa jaksotunnisteiden nro 2 tai 4 mukainen, tai 35 IL-1R:n kyseessä ollessa jaksotunnisteiden nro 6 tai 8

mukainen, asemissa 1 - 5 oleva aminohappo. C-terminaalista päätä voidaan tyypistää tarkoituksellisesti ilmentämisvektorien konstruoinnin aikana (esimerkiksi konstruoidaessa edellä olevan kuvauksen mukaisia liukoisia proteiineja koodaavia vektoreita) tai se voi johtua eri tavalla tapahtuneesta muokkautumisesta, jossa esimerkiksi voi poistua korkeintaan noin 5 C-terminaalista aminohappoa.

Muissa TNF-R- ja IL-1R-polypeptideissä, joiden käyttö voi tulla kysymykseen, on haluttu biologinen aktiivisuus jäljellä mutta niiden jakso voi poiketa natiivista jaksosta siinä mielessä, että natiiviin jaksoon on lisätty tai siitä on poistettu aminohappoja tai siinä olev(i)a aminohappo(ja) on korvattu jo(i)llakin muulla (muilla) aminohapo(i)lla. Tällaisten proteiinien biologinen aktiivisuus voidaan varmistaa tässä keksinnössä kuvattuja määrityksiä käyttäen.

Tässä esitetyn TNF-R:n ja IL-1R:n johdannaisiin kuuluu myös useita primäärisen proteiinin erilaisia rakennemuotoja, joiden biologinen aktiivisuus on säilynyt. TNF-R- tai IL-1R-proteiini voi esimerkiksi siinä olevien ionisoituvien amino- ja karboksyyli-ryhmien vuoksi olla happamien tai emäksisten suolojen muodossa tai se voi olla neutraalissa muodossa. Yksittäisiä aminohapporyhmiä voidaan myös modifioida hapettamalla tai pelkistämällä.

Primääristä aminohapporakennetta voidaan modifioida muodostamalla kovalenttisia tai aggregatiivisia konjugaatteja muiden kemiallisten ryhmien kanssa, kuten glykosyyli-ryhmien, lipidien, fosfaatin, asetyyli-ryhmien ja muiden näitä vastaavien ryhmien kanssa. Kovalenttisia johdannaisia valmistetaan liittämällä tiettyjä nimenomaisia funktionaalisia ryhmiä aminohappojen sivuketjuihin tai N- tai C-terminaaliin päihin. Luonnossa esiintyviä variantteja voi syntyä RNA:n vaihtoehtoisista silmukoitumistapahtumista.

Muihin proteiineihin, joita voidaan käyttää tässä esitettyssä fuusioproteiineissa, kuuluu TNF-R:n tai IL-1R:n muiden polypeptidien kanssa muodostamia konjugaatteja, joi-

ta voidaan valmistaa N-terminaalisisina tai C-terminaalisisina fuusioina syntetoimalla viljelmissä yhdistelmä-DNA-menetelmien avulla. Esimerkiksi konjugoitu peptidi voi olla proteiinin N-terminaalisisella alueella oleva signaali (tai johto) -peptidijakso, joka translaation kanssa samanaikaisesti tai translaation jälkeen ohjaa proteiinin siirtymistä synteessipaikaltaan toimintakohtaansa solumembraanin sisä- tai ulkopuolella tai soluseinämän sisä- tai ulkopuolella (esimerkiksi hiivan α -tekijän johtojakso). Fuusioproteiinit voivat sisältää peptidejä, joita on lisätty fuusioproteiinin puhdistamisen tai tunnistamisen edistämiseksi. Tällaisiin peptideihin kuuluvat esimerkiksi poly-His tai anti-geeniset tunnistuspeptidit, joita on kuvattu US-patenttijulkaisussa nro 5 011 912 ja julkaisussa Hopp, et al., Bio/Technology 6 (1988) 1204. Yksi tällainen peptidi on FLAG[®]-peptidi, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK), joka on erittäin antigeeninen ja josta saadaan käyttöön spesifiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen palautuvasti sitoutuva epitooppi, jonka avulla ilmennetty yhdistelmäproteiini on mahdollista määrittää nopeasti ja puhdistaa vaikeuksista. Tämä jakso pilkkoutuu myös spesifisesti naudan limakalvon enterokinaasilla kohdasta, joka sijaitsee välittömästi vierekkäisten Asp-Lys-ryhmien jälkeen. Fuusioproteiinit, joiden pääteryhmänä on tämä peptidi, voivat myös olla vastustuskykyisiä solunsisäiselle pilkkoutumiselle E. colissa. Muriinihybridooma, jolle on annettu nimitys 4E11, tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta, joka sitoo peptidiä DYKDDDDK tiettyjen divalenttisten metallikationeiden läsnä ollessa (US-patenttijulkaisussa 5 011 912 kuvatulla tavalla), ja se on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection hakunumerolla HB 9 259.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetut fuusioproteiinit sisältävät sellaista TNF-R:ää tai sellaista IL-1R:ää, joissa glykosylaatio on tapahtunut joko näiden omalla luonnollaisella tavalla tai tästä poikkeavalla tavalla. Hiivassa tai nisäkäsilmmentämisjärjestelmissä, esimerkiksi COS-7-so-

luissa, ilmennettyjen TNF-R:n ja IL-1R:n suhteellinen moolimassa ja glykosyloitumistapa voi olla ilmentämisjärjestelmän mukaan samanlainen tai hieman erilainen kuin natiiveissa molekyyliyksissä. Ei-glykolysoituneita proteiineja saadaan yhdistelmä-proteiinien ilmentämisestä bakteereissa, kuten *E. coli*ssa. Proteiineja, joissa on inaktivoituja N-glykosylaatiokohtia, voidaan tuottaa oligonukleotidisynteesillä ja ligaatiolla tai kohdemutageneesimenetelmillä. Näitä mutatoituneita proteiineja voidaan valmistaa hyvästä saannosta tinkimättä homogeenisessa ja vähän hiilihydraattia sisältävässä muodossa hiivailmentämisjärjestelmiä käyttäen. Luonteenomainen piirre eukaryoottisissa proteiineissa oleville N-glykosylaatiokohdille on aminohappotripletti Asn-A₁-Z, jossa A₁ on mikä tahansa aminohappo paitsi Pro ja Z on Ser tai Thr. Se sivuketjun aminoryhmä, johon hiilihydraatti liittyy kovalenttisesti, tulee tässä jaksossa olevasta asparagiinista. Tämä kohta voidaan hävittää korvaamalla Asn toisella aminohapolla tai ryhmällä Z, poistamalla Asn tai Z tai liittämällä aminohappojen A₁ ja Z väliin aminohappo, joka ei ole Z, tai aminohappojen Asn ja A₁ väliin jokin muu aminohappo kuin Asn. Tunnettuihin menetelmiin proteiineissa olevien N-glykosylaatiokohtien inaktivoimiseksi sisältyvät US-patenttijulkaisussa 5 071 972 ja julkaisussa EP-276 846 kuvatut menetelmät. Esimerkkejä tyyppin II humaani-IL-1R:ssä olevista N-glykosylaatiokohdista ovat jaksotunnisteissa numero 8 olevat aminohapot 53 - 55, 59 - 61, 99 - 101, 206 - 208 ja 264 - 266. Tyyppin I IL-1R-proteiinissa (jaksotunniste nro 6) esiintyy potentiaalisia N-glykosylaatiokohtia aminohappojen 80 - 82, 173 - 175, 213 - 215, 229 - 231, 243 - 245 ja 277 - 279 kohdalla. Kuvioissa 2A - 2B esiintyy N-glykosylaatiokohtia TNF-R:n aminohappojen 171 - 173 ja 358 - 360 kohdalla.

Kysteiniiniryhmät, jotka eivät ole välttämättömiä biologiselle aktiivisuudelle, voidaan deletoida tai korvata muilla aminohapoilla tarpeettomien tai vääränlaisten molekyylin sisäisten disulfidisiltojen muodostumisen ehkäisemi-

seksi molekyylien renaturoituessa. Voidaan esimerkiksi de-
letoida kyseiniiryhmä, joka on kuvioiden 2A - 2B mukaisen
TNF-R:n jakson asemassa 178. US-patenttijulkaisussa nro
4 518 584 on kuvattu kohdemutageneesin käyttö proteiinissa
5 olevien kysteiniiniryhmien deletoimiseksi tai korvaamiseksi.
Muihin lähestymistapoihin mutageneesin aikaansaamiseksi
liittyvät vierekkäisten kaksiemäksisten aminohapporyhmien
modifiointi sellaisissa hiivajärjestelmissä tapahtuvan il-
mentymisen edistämiseksi, joissa esiintyy KEX2-proteaasi-
10 aktiivisuutta. Julkaisussa EP-212 914 on kuvattu kohdemuta-
geneesin käyttö proteiinissa olevien KEX2-proteaasin muok-
kauskohtien inaktivoimiseksi. TNF-R:n ja IL-1R:n biologisen
aktiivisuuden säilyttämiseksi on korvaamisesta tuloksena
edullisesti homologisia tai konservatiivisesti substituoi-
15 tuja jaksoja, mikä tarkoittaa sitä, että tietty aminohappo-
ryhmä korvataan ryhmällä, jolla on samantyyppiset fysikoke-
mialliset ominaisuudet. Esimerkkeihin konservatiivisista
substituutioista kuuluvat yhden alifaattisen ryhmän korvaa-
minen toisella, kuten Ile:n, Val:n, Leu:n tai Ala:n korvaa-
20 minen toinen toisillaan, tai yhden poolisen ryhmän korvaa-
minen toisella, kuten Lys:n ja Arg:n; Glu:n ja Asp:n; tai
Gln:n ja Asn:n väliset korvaukset. Tunnetaan muita tällai-
sia konservatiivisia korvaamisia, esimerkiksi sellaisten
kokonaisten alueiden korvaamisia, joiden hydrofobiset omi-
naisuudet ovat samanlaisia. Lisäksi tiettyjä humaani-,
25 muriini- tai muiden nisäkäslajien TNF-R-molekyylien välillä
olevat tietyt nimenomaiset aminohappoeroavuudet viittaavat
muihin konservatiivisiin substituutioihin, joita voidaan
tehdä TNF-R:n tai IL-1R:n olennaisia biologisia ominaisuuksia
30 muuttamatta.

Natiivia aminohappojaksoa voidaan muuttaa millä ta-
hansa usealla tunnetulla menetelmällä. Mutaatioita voidaan
valmistaa tiettyihin nimenomaisiin lokuksiin syntetisoidulla
oligonukleotideja, jotka sisältävät mutatoitun jakson, jon-
35 ka molemmiin puolin on restriktiokohdat, joiden avulla tämä
kyetään ligatoimaan natiivin jakson fragmentteihin. Ligaa-

tion jälkeen koodaa tulokseksi saatu rekonstruoitu jakso analogia, jossa on haluttu aminohappoinsertio, -substituoitio tai -deleetio.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää oligonukleotidiko-

5 kohdemutageneesimenetelmiä sellaisen muunnetun geenin aikaansaamiseksi, jossa on vaaditun substituution, deleetion tai insertion mukaiset tietyt nimenomaiset kodonit. Kuvia-

10 via esimerkkejä edellä kuvattujen muutosten tekemisestä on esitetty julkaisuissa Walder, et al. [Gene 42 (1986) 133]; Bauer, et al. [Gene 37 (1985) 73]; Craik [BioTechniques, (tammikuu 1985) 12 - 19]; Smith, et al. [Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981)]; ja soveltuvia menetelmiä on kuvattu US-patenttijulkaisuissa nro 4 518 584 ja 4 737 462, jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

15

Aminohappojakson variantti on edullisesti ainakin 80-%:isesti identtinen ja edullisimmin ainakin 90-%:isesti identtinen natiiviin jaksoon verrattuna. Samanlaisuusaste voidaan määrittää esimerkiksi vertaamalla jaksoa koskevaa

20 informaatiota käyttäen GAP-tietokoneohjelman versiota 6,0, joka on saatavilla laitoksesta University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). GAP-ohjelmassa on hyödynnetty Needlemanin ja Wunschlin [J. Mol. Biol. 48 (1970) 443] kohdistusmenetelmää, sellaisena kun se on uudistettu julkaisussa Smith ja Waterman [Adv. Appl. Math. 2 (1981) 482].

25 GAP-ohjelmassa on pääpiirteittäin esitettynä kysymys samanlaisuuden määrittämisestä sen suhteen avulla, joka saadaan jakamalla samanlaisten kohdistettujen symbolien (toisin sanoen nukleotidien tai aminohappojen) lukumäärä niiden symbolien lukumäärällä, jotka ovat lyhyemmässä näistä kahdesta jaksosta. Edullisiin GAP-ohjelman muuttujien oletusarvoihin kuuluvat (1) nukleotidien unaarinen vertailumatriisi (tämä sisältää arvon 1 identtisiä tuloksia varten ja arvon 0 ei-identtisiä tuloksia varten) ja Gribskov'in ja Burgess'in, Nucl. Acids Res. 14 (1986) 6745, painotettu vertailumatriisi sen mukaisessa muodossa, joka on kuvattu julkaisussa

30

35

Schwartz ja Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, s. 353 - 358 (1979); (2) 3,0:n suuruinen vähennys kustakin aukosta ja yksi ylimääräinen 0,10:n suuruinen vähennys kussakin aukossa olevasta kustakin symbolista; ja (3) vähennykset jätetään suorittamatta päissä olevien aukkojen kyseessä ollessa.

Edellä kuvattujen IL-1R-polyeptidien tilalla voidaan keksinnön mukaisesti valmistetuissa fuusioproteiineissa käyttää muita proteiineja, jotka kykenevät estämään IL-1:n sitoutumisen soluissa oleviin reseptoreihin in vivo -olosuhteissa. Tällaisiin proteiineihin, joita tavallisesti nimitetään IL-1:n reseptoriantagonisteiksi, sisältyvät tavallisesti proteiinit, joita on kuvattu julkaisuissa Eisenberg, et al. [Nature 343 (1990) 341], Hannum, et al. [Nature 343 (1990) 336] ja Carter, et al. [Nature 344 (1990) 633], jotka on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Nämä antagonistiproteiinit sitoutuvat IL-1:n reseptoreihin mutta niillä ei ole IL-1:tä muistuttavaa aktiivisuutta (ne eivät välitä signaalia tai tuota muulla tavoin niitä biologisia vaikutuksia, jotka ovat tulosta IL-1:n sitoutumisesta solujen IL-1-reseptoriin). Nämä antagonistiproteiinit kilpailevat IL-1:n kanssa sitoutumisesta endogeenisiin IL-1:n reseptoreihin ja inhiboivat siten IL-1:n välityksellä tapahtuvia biologisia vaikutuksia in vivo -olosuhteissa.

Yhdistelmä-fuusioproteiineja koodaavat DNA-jaksot

Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön eristettyjä DNA-jaksoja, jotka koodaavat edellä kuvattuja fuusioproteiineja. Kyseistä fuusioproteiinia koodaava DNA-jakso konstruoidaan käyttäen yhdistelmä-DNA-menetelmiä IL-1R- tai TNF-R-polyeptidejä koodaavien DNA-fragmenttien liittämiseksi asiaankuuluvaan ilmentämisvektoriin. TNF-R:ää koodaavan DNA-fragmentin 3'-puoleinen pää ligatoidaan (peptidikytkijäjakson välityksellä) IL-1R:ää koodaavan DNA-fragmentin 5'-puoleiseen päähän siten, että jaksojen lukukehyk-

set ovat samassa vaiheessa, jotta mRNA:n translaatiosta on mahdollista saada yksi biologisesti aktiivinen fuusioproteiini. Vaihtoehtoisesti voidaan IL-1R:ää koodaavan DNA-fragmentin 3'-puoleinen pää ligatoida (peptidikytkijäjaks

5 välityksellä) TNF-R:ää koodaavan DNA-fragmentin 5'-puoleiseen päähän menetellen niin, että jaksojen lukukehykset ovat samassa vaiheessa, jotta mRNA:sta on mahdollista saada translaatiossa yksi biologisesti aktiivinen fuusioproteiini. Samaan lukukehykseen voidaan ligatoida vielä yksi TNF-

10 R:ää koodaava jakso sellaisen jakson aikaansaamiseksi, joka koodaa kahta TNF-R-polypeptidiä ja yhtä IL-1R-polypeptidiä sisältävää fuusioproteiinia. IL-1R:ää koodaava jakso sijoitetaan edullisesti TNF-R:ää koodaavaan (koodaaviin) jaksoon (jaksoihin) nähden vastasuuntaan. Vaikkakin fuusioproteiini

15 voi TNF-R-peptidin (peptidien) ohella sisältää kahta IL-1R-polypeptidiä, on edullista käyttää yhtä IL-1R:ää. Yhdestä IL-1R:stä saadaan haluttu korkean affiniteetin IL-1:n sitomisaktiivisuus ilman niitä mahdollisia haittoja, jotka syntyvät toisen IL-1R:n lisäämisen aiheuttamasta fuusioproteiinin koon suurentumisesta. Tällaisiin haittoihin voi

20 kuulua vektorin konstruktio menetelmien tuleminen monimutkaisemmiksi ja mahdollinen halutun proteiinin ilmentymistason pieneneminen. Toisessa tämän keksinnön sovellutusmuodossa ligatoidaan TNF-R:ää koodaava DNA-jakso kytkijäjaksoon, joka puolestaan ligatoidaan toiseen TNF-R:ää koodaavaan jaksoon.

N-terminaalista signaalijaksoa koodaava DNA-jakso voidaan säilyttää N-terminaalista polypeptidiä koodaavassa DNA-jaksossa, kun taas myötäsuuntaan sijaitsevan (sijaitsevien) DNA-jakso(je)n läpiluvun mahdollisesti estävät lopetuskodonit hävitetään. Käänteisesti pitää paikkansa, että C-terminaalista polypeptidiä koodaavaan DNA-jaksoon jätetään tavallisesti translaation lopettamiseen tarvittava lopetuskodoni. Signaalijaksoa koodaava DNA on edullista poistaa muista DNA-jaksoista kuin N-terminaalista polypeptidiä koodaavista jaksoista.

30

35

Haluttua peptidikytkijäjaksoa koodaava DNA-jakso voidaan liittää TNF-R:ää tai IL-1R:ää koodaavien DNA-jaksojen väliin näiden kanssa samaan lukukehykseen käyttäen mitä tahansa sopivaa tavanomaista menetelmää. Esimerkiksi

5 TNF-R:ää tai IL-1R:ää koodaavien jaksojen väliin voidaan ligatoida kemiallisesti syntetioitu oligonukleotidi, joka koodaa kytkijäjaksoa ja joka sisältää asianmukaiset restriktioendonukleaaasin katkaisukohtat. Vaihtoehtoisesti voi kemiallisesti syntetioitu DNA-jakso sisältää jakson, joka on

10 komplementaarinen joko TNF-R:n tai IL-1R:n 3'-puoleisen terminaalisen pään suhteen (ilman lopetuskodonia), jota seuraa kytkijäjaksoa koodaava jakso, jonka jälkeen tulee sellainen 5'-puoleisen terminaalisen pään suhteen komplementaarinen jakso, joka vastaa jompaa kumpaa proteiineista

15 TNF-R tai IL-1R. Tämän jälkeen käytetään oligonukleotidikohtemutageneesia kytkijäjaksoa koodaavan jakson liittämiseksi vektoriin, joka sisältää TNF-R:n ja IL-1R:n suoran fuusion. Toisessa menetelmässä käytetään sellaisilla alukkeilla tehtyjä polymeraasiketjureaktioita, joihin sisältyy

20 peptidikytkijäjaksoa koodaavia osittain yksinauhaisia segmenttejä. PCR:n avulla muodostetut kahta erilaista proteiinia koodaavat DNA-fragmentit voidaan liittää yhteen antamalla kunkin fragmentin terminaalisisessä päässä olevien yksinauhaisten kytkijäjaksoa koodaavien segmenttien liittyä

25 pituussuunnassa yhteen. Edullisia menetelmiä kytkijäjaksoa koodaavan DNA-segmentin liittämiseksi TNF-R:n ja IL-1R:n DNA-jaksojen väliin (tai kahden TNF-R-DNA-jakson väliin) on kuvattu tuonnempana olevissa esimerkeissä 11 ja 12.

TNF-R:ää ja IL-1R:ää koodaavia DNA-jaksoja voidaan

30 eristää millä tahansa sopivalla tavanomaisella menetelmällä, joka soveltuu käytettäväksi tämän keksinnön mukaista fuusioproteiinia koodaavien DNA-jaksojen konstruoimisessa. Mikro-organismissa ilmennettäviä fuusioproteiineja koodaavat DNA-jaksot eivät edullisesti sisällä yhtään intronia, jotka voisivat lopettaa DNA:n transkription mRNA:ksi enneaikaisesti; transkription enneaikainen lopettaminen voi

35

olla haluttua esimerkiksi silloin, kun tästä on tuloksena mutantteja, joiden C-terminaaliset päät ovat typistyneet edullisella tavalla, joista kuvaava esimerkki on transmembraanialueen deletio sellaisen liukoisen reseptorin aikaansaamiseksi, joka ei ole sitoutunut solumembraaniin. Sopivia menetelmiä tyyppin I ja tyyppin II IL-1R:n cDNA:n kloonaukseksi ovat menetelmät, joita on esitetty esimerkeissä 8 ja 9, vastaavassa järjestyksessä ilmoitettuna. TNF-R:n cDNA voidaan eristää menetelmillä, joihin kuuluvat esimerkiksi 3 selitetyt menetelmät.

TNF-R:n koodaava jakso voidaan hankkia käyttöön eristämällä TNF-R:ää koodaava jakso yhdistelmä-cDNA- tai genomien DNA-kirjastoista. cDNA-kirjasto konstruoidaan edullisesti hankkimalla käyttöön nisäkkään TNF-R:ää ilmentävää polyadenyloitua mRNA:ta tietystä nimenomaisesta solulinjasta, esimerkiksi humaanifibroblastisolulinjasta WI-26 VA4 (ATCC CCL 95.1) ja käyttämällä tätä mRNA:ta templaattina kaksinauhaisen cDNA:n syntetisointiksi. Tämän jälkeen kaksinauhainen cDNA pakataan yhdistelmä-vektoriin, joka tuodaan isäntäsoluun (esimerkiksi asiaankuuluvaan *E. coli* -kantajaan), jota sitten kasvatetaan. cDNA-kirjaston sisältämät TNF-R-jaksot voidaan tunnistaa seulomalla kirjasto asiaankuuluvalla nukleinihappokoettimella, joka kykenee hybridisoitumaan humaanin TNF-R:n cDNA:han. Toinen kloonauksen menetelmä, jota voidaan käyttää, on tuonnempana esimerkissä 3 kuvattu suora ilmentämismenetelmä. Vaihtoehtoisesti voidaan TNF-R-proteiineja koodaavia DNA-molekyylejä koota yhteen ligatoimalla synteettisiä oligonukleotidialayksikköjä, jotka joko kokonaisuudessaan tai osittain vastaavat kuvioiden 2A - 2B mukaista jaksoa, täydellisen koodaavan jakson aikaansaamiseksi.

Muita cDNA-klooneja voidaan eristää muista nisäkkäslajeista peräisin olevista cDNA-kirjastoista lajien välillä hybridisaatiolla. TNF-R:ää tai IL-1R:ää koodaava DNA voidaan sen käyttämiseksi hybridisoinnissa varustaa kovalenttisella leimalla käyttäen havaittavaa ainetta, kuten

fluoresoivaa ryhmää, radioaktiivista atomia tai kemiluminesoivaa ryhmää, asiaankuuluvan alan ammattikokemuksesta tunnetuilla menetelmillä.

5 TNF-reseptoreja ja IL-1-reseptoreja koodaavat useimpien nisäkäsgeenien tavoin otaksuttavasti monieksoniset geenit. Sellaisten vaihtoehtoisten mRNA-konstruktioiden, joiden voidaan katsoa syntyneen transkription jälkeen tapahtuneista erilaisista mRNA:n silmukointitapahtumista ja joissa on siinä määrin suuria tässä keksinnössä kuvattujen
10 cDNA-molekyylien suhteen identtisiä alueita tai samanlaisia alueita, että ne koodaavat biologisesti aktiivista TNF-R:ää tai IL-1R:ää, katsotaan olevan käyttökelpoisia tässä valmistettävien fuusioproteiinien valmistamisessa.

Liukoisia TNF-R- ja IL-1R-polyptidejä koodaavaa
15 DNA:ta voidaan valmistaa millä tahansa useista tavanomaisista menetelmistä. Haluttua liukoista polypeptidiä koodaava DNA-fragmentti voidaan jatkokloonata ilmentämisvektoriin. DNA-fragmentteja voidaan valmistaa pilkkomalla täysimittainen kloonattu DNA-jakso restriktioendonukleasilla ja eristää ne elektroforeesilla agarosigeeleissä. Vaihtoehtoisesti voidaan haluttu DNA-jakso syntetoida kemiallisesti tunnettuja menetelmiä käyttäen. Halutun DNA-fragmentin liittämiseksi ilmentämisvektoriin voidaan käyttää restriktioendonukleasin katkaisukohtan (-kohtia) sisältäviä
20 kytkijäjaksoja tai fragmentti voidaan pilkkoa tässä luonnostaan esiintyvistä katkaisukohtista.

Haluttua liukoista proteiinifragmenttia koodaavan DNA-jakson eristämiseen voidaan käyttää myös tunnettuja polymeerasiketjureaktio (PCR) -menetelmiä. Tätä menetelmää on
30 kuvattu tuonnempana olevissa esimerkeissä.

Toisessa ratkaisutavassa voidaan käyttää entsymaattista käsittelyä (käyttäen Bal 31 -eksonukleasia) terminaalisten nukleotidien deletoimiseksi DNA-fragmentista sellaisen fragmentin aikaansaamiseksi, jolla on tietty nimenomainen haluttu terminaalinen pää. Kaupallisesti saatavilla
35 olevia kytkijäjaksoja ovat sellaiset jaksot, joita voidaan

ligatoida Bal 31:llä tehdyn pilkkomisen synnyttämiin tasaisiin päihin ja jotka sisältävät restriktioendonukleaasi(e)n katkaisukohtan (-kohtia). Vaihtoehtoisesti voidaan syntetoida oligonukleotideja, joiden avulla DNA-fragmentin N- tai C-terminaalinen pää voidaan rekonstruoida haluttuun kohtaan. Oligonukleotidi voi sisältää restriktioendonukleaasin katkaisukohtan, joka sijaitsee vastasuunnassa haluttuun koodaavaan jaksoon nähden ja se voi asettaa aloituskodonin (ATG) koodaavan jakson N-terminaalisen pään kohdalle.

TNF-R:n ja IL-1R:n DNA-jaksot voivat erota jakso-tunnisteissa nro 1, 3, 5 ja 7 esitetyistä DNA-jaksoista. Esimerkiksi geneettisen koodin tunnetun degeneratiivisuuden vuoksi voi samaa aminohappojaksoa koodaavissa nukleotidijaksoissa olla huomattavaa vaihtelua. DNA-jaksojen, jotka kykenevät hybridisoitumaan jaksotunnisteiden nro 1, 3, 5 ja 7 mukaisiin DNA-jaksoihin kohtuullisen rajoittavissa olosuhteissa (55 °C, 5 x SSC) ja jotka koodaavat biologisesti aktiivista TNF-R- tai IL-1R-polypeptidiä, katsotaankin tässä keksinnössä olevan TNF-R:ää koodaavia tai IL-1R:ää koodaavia DNA-jaksoja, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna. Natiiveihin DNA-jaksoihin voidaan tehdä tarkoituksellisesti mutaatioita, esimerkiksi edellä kuvattujen aminohapposubstituutioiden, -deleetioiden ja -insertioiden aikaansaamiseksi. Tietyt näistä mutaatioista eivät ilmenny lopullisessa proteiinituotteessa. Esimerkiksi ilmentämisen tehostamiseksi voidaan tehdä nukleotidisubstituutioita, joiden tarkoituksena on pääasiassa välttää silmukoiden muodostumista transkriptiossa syntyvän mRNA:n sekundäärirakenteeseen (tätä on käsitelty julkaisussa EP-75 444, joka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla). Nukleotidijaksoon voidaan tehdä muita muutoksia sellaisten kodonien aikaansaamiseksi, joiden translaatio valitussa isännässä on muita vaihtoehtoja tehokkaampaa, esimerkiksi tunnetut E. colin suosimat kodonit E. colissa tapahtuvan ilmentämisen kyseessä ollessa. Polymeraasiketjureaktioissa

voi myös tapahtua vaikutuksettomia mutaatioita (DNA-jakson muutokset, jotka eivät muuta jakson koodaamaa aminohappojaksoa). Yhdessä tämän keksinnön sovellutusmuodossa muutetaan jaksotunnisteen numero 5 (tyypin I IL-1R) nukleotidi numero 437 T:stä C:ksi. Tämä vaikutukseton mutaatio oli syntynyt polymeraasiketjureaktion aikana.

Nukleotidijaksoissa olevien mutaatioiden on luonnollisesti oltava sellaisia, että koodaavien jaksojen lukukehyyksen oikea vaihe säilyy. Mutaatiot eivät edullisesti muodosta komplementaarisia alueita, jotka hybridisoituisivat ja muodostaisivat sekundäärisiä mRNA-rakenteita, kuten silmukoita tai hiusneularakenteita, jotka vaikuttaisivat haittaavasti fuusioproteiini-mRNA:n translaatioon.

Tästä keksinnöstä saadaan siten käyttöön tämän keksinnön mukaisia DNA-jaksoja, jotka koodaavat edellä kuvattuja fuusioproteiineja, joissa fuusioproteiinin DNA-jaksossa oleva kukin TNF-R:n DNA-jakso on: (a) jokin sellainen DNA-jakso, joka on peräisin nisäkkään natiivin TNF-R-geenin koodaavasta alueesta (esimerkiksi jaksotunnisteen numero 1 tai 3 mukaisesta koodaavasta alueesta peräisin olevasta cDNA:sta); (b) jokin sellainen DNA-jakso, joka kykenee hybridisoitumaan kohdan (a) mukaiseen DNA-jaksoon kohtalaisesti rajoittavissa olosuhteissa (50 °C, 2 x SSC) ja joka koodaa biologisesti aktiivista TNF-R:ää; tai (c) jokin sellainen DNA-jakso, joka on geneettisen koodin vuoksi degeneratiivinen kohdissa (a) tai (b) määriteltujen DNA-jaksojen suhteen ja joka koodaa biologisesti aktiivista TNF-R:ää. Fuusioproteiinin DNA-jakso voi samalla tavoin sisältää sellaista (sellaisia) IL-1R:ää koodaavaa (koodaavia) DNA-jakso(j)a, jo(t)ka on (ovat) (a) jokin sellainen DNA-jakso, joka on peräisin nisäkkään natiivin IL-1R-geenin koodaavasta alueesta (esimerkiksi jaksotunnisteen numero 5 tai 7 mukaisesta koodaavasta alueesta peräisin olevasta cDNA:sta); (b) jokin sellainen DNA-jakso, joka kykenee hybridisoitumaan kohdan (a) mukaiseen DNA-jaksoon kohtalaisesti rajoittavissa olosuhteissa (55 °C, 5 x SSC) ja joka

koodaa biologisesti aktiivista IL-1R:ää; tai (c) jokin sel-
lainen DNA-jakso, joka on geneettisen koodin vuoksi degene-
ratiivinen kohdissa (a) tai (b) määriteltyjen DNA-jaksojen
suhteen ja joka koodaa biologisesti aktiivista IL-1R:ää.

5 **Yhdistelmä-fuusioproteiinien ilmentäminen**

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön yhdistelmäilmen-
tämisvektoreita tässä esitettyjä fuusioproteiineja koodaa-
van DNA:n ilmentämiseksi. Tämän keksinnön mukaiset yhdis-
telmä-ilmentämisvektorit ovat replikoituvia DNA-konstruk-
tioita, jotka sisältävät synteettisen tai cDNA:sta peräisin
olevan DNA-jakson, joka koodaa yhtä edellä kuvatuista fuu-
sioproteiineista ja joka on liitetty toiminnallisesti sopi-
viin transkription ja translaation säätely-yksikköihin.
Esimerkkeihin geneettisistä yksiköistä, joilla on säätely-
tehtävä geenien ilmentämisessä, kuuluvat transkription pro-
moottorit, operaattorit tai enhancer-jaksot, sopivia
mRNA:ssa olevia ribosomin sitoutumiskohtia koodaava jakso
sekä asiaankuuluvat transkription ja translaation aloitus-
ja lopetusjaksot. Vektoriin voidaan lisäksi liittää omi-
naisuus, joka antaa sille kyvyn replikoitua isännässä ja
joka tavallisesti on replikaation alkukohta, sekä selektio-
geeni transformanttien tunnistamisen edistämiseksi. Ilmen-
tämisvektoreissa käytetyt säätely-yksiköt ovat tavallisesti
peräisin nisäkkäiden, mikrobien, virusten tai hyönteisten
geeneistä. Voidaan myös käyttää retroviruksista peräisin
olevia ilmentämisvektoreita.

DNA-alueet ovat toiminnallisesti liitettynä, kun ne
ovat toiminnallisessa suhteessa keskenään. Fuusioproteiinia
koodaavan DNA-jakson sanotaan olevan liitettynä toimin-
nallisesti yhteen tai useampaan edellä kuvattuun säätely-
yksikköön, kun fuusioproteiinin DNA-jakso osallistuu tran-
skriptioon tai tulokseksi saatava mRNA osallistuu trans-
laatioon tämän (näiden) säätelyelement(t)i(e)n ohjaamana.

Transformoidut isäntäsolut ovat soluja, jotka on
transformoitu tai transfektoitu vieraalla DNA:lla käyttäen
yhdistelmä-DNA-menetelmiä. Tässä keksinnössä vieras DNA si-

sältää tässä esitettyä fuusioproteiinia koodaavan jakson. Isäntäsolut voidaan transformoida vieraan DNA:n kloonauk- tai monistustarkoituksissa tai ne voidaan transformoida ilmentämisvektorilla fuusioproteiinin tuottamiseksi asiaan-
 5 kuuluvien promoottorien ohjaamina. Sopiviin isäntäsoluihin kuuluvat prokaryootit, hiivasolut tai korkeampien eukaryoottien solut. Asianmukaisia kloonauk- ja ilmentämisvektoreita, jotka soveltuvat käytettäviksi bakteeri-, sieni-,
 10 hiiva- ja nisäkässoluisännissä, on kuvattu teoksessa Pouwels, et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985), jossa olevat asiaankuuluvat selitykset on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Fuusioproteiinin valmistamiseen voidaan
 15 myös käyttää soluttomia translaatiojärjestelmiä, joissa käytetään tämän keksinnön mukaisista DNA-konstruktioista peräisin olevia RNA-molekyylejä.

Prokaryootteihin kuuluu gramnegatiivisia tai grampositiivisia organismeja. Prokaryoottiset ilmentämisvektorit sisältävät tavallisesti yhden tai useamman fenotyyppisesti selektoitavissa olevan markkerin, esimerkiksi sellaisia proteiineja koodaavan geenin, joka tuottaa antibiootiresistenssin tai täydentää auksotrofisen kasvuvaatimuksen, sekä isännän tunnistaman replikaation alkukohdan isännässä tapahtuvan monistumisen varmistamiseksi. Esimerkkeihin
 20 transformaatioon soveltuvista sopivista prokaryoottisista isännistä kuuluvat *E. coli*, bacillukset, kuten *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ja useat *Pseudomonas*-, *Streptomyces*- ja *Staphylococcus*-sukujen erilaiset lajit, vaikka harkinnan mukaan on mahdollista käyttää muitakin
 30 bakteereita.

Bakteerikäyttöön käyttökelpoiset ilmentämisvektorit voivat sisältää selektoitavissa olevan markkerin ja bakteerin replikaation alkukohdan, jotka ovat peräisin kaupallisesti saatavilla olevista plasmideista, jotka sisältävät tunnetun kloonaukvektorin pBR322 (ATCC 37 017) geneettisiä yksikköjä. Näihin kaupallisiin vektoreihin kuulu-

vat esimerkiksi pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi) ja pGEM1 (Promega Biotec, Madison WI, USA). Nämä pBR322:n "runko"-osat yhdistetään asiaankuuluvaan promoottoriin ja ilmennettävään rakenteelliseen jaksoon.

5 E. coli transformoidaan tyypillisesti pBR322:n johdannaisilla, joka plasmidi on E. coli -lajista peräisin oleva plasmidi [Bolivar, et al., Gene 2 (1977) 95]. pBR322 sisältää ampicilliini- ja tetrasykliiniresistenssigeenit, joista saadaan käyttöön yksinkertainen keino transformoitujen solujen tunnistamiseksi.

10

Yhdistelmämikrobi-ilmentämisvektoreissa tavallisesti käytetyt promoottorit sisältävät β -laktamaasi- (penisilinaasi-) ja laktoosipromoottorijärjestelmän [Chang, et al., Nature 275 (1978) 615; ja Goeddel, et al., Nature 281 (1979) 544]; tryptofaani (trp) -promoottorijärjestelmän [Goeddel, et al., Nucl. Acids Res. 8 (1980) 4057; ja EP-hakemusjulkaisu 36 776] sekä tac-promoottorin [Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412 (1982)]. Yhdessä erityisen käyttökelpoisessa bakteeri-ilmentämisjärjestelmässä käytetään faagi λ :n P_L -promoottoria ja lämpöindusoituvaa cI857ts-repressoria. Niihin plasmidivektoreihin, jotka ovat saatavilla talletuslaitoksesta American Type Culture Collection ja jotka sisältävät λ :n P_L -promoottorin johdannaisia, kuuluvat plasmidi pHUB2, joka on E. coli -kannassa JMB9 (ATCC 37 092) ja pPLc28, joka on E. coli RR1:ssä (ATCC 53 082).

15

20

25

Yhdistelmäfuusioproteiinia voidaan myös ilmentää hiivaisännissä, jotka ovat edullisesti peräisin Saccharomyces-lajeista, kuten S. cerevisiae. Voidaan myös käyttää muiden sukujen, kuten Pichian tai Kluyveromycesin, hiivaja. Hiivavektorit sisältävät tavallisesti 2 μ m:n hiivaplasmidista tai autonomisesti replikoituvasta jaksosta (ARS) peräisin olevan replikaation alkukohdan, promoottorin, fuusioproteiinia koodaavan DNA:n, polyadenylylaatioon ja transkription terminaatioon kuuluvat jaksot sekä selektio-geenin. Hiivavektorit sisältävät edullisesti replikaation

30

35

alkukohdan ja selektoitavissa olevat markkerit, jotka mahdollistavat sekä hiivan että *E. coli* transformoimisen, esimerkiksi *E. coli* ampisilliiniresistenssigeenin ja *S. cerevisiae* *trp1*-geenin, josta saadaan selektiomarkkeri hiivan mutanttikannoille, joilta puuttuu kyky kasvaa tryptofaani-
5 nissa, ja voimakkaasti ilmentyvistä hiivageenistä peräisin olevan promoottorin myötasuuntaan olevan rakennegeenin transkription käynnistämiseksi. Hiivaisäntäsolun genomissa oleva *trp1*-vaurio muodostaa sitten tehokkaat puitteet
10 transformoimisen havaitsemiselle kasvusta ilman tryptofaania.

Sopiviin promoottorijaksoihin hiivavektoreissa kuuluvat metallotioneiinin promoottori, 3-fosfoglyseraattiki-
naasin promoottori [Hitzeman, et al., *J. Biol. Chem.* 255
15 (1980) 2073] tai muiden glykolyyttisten entsyymien promoottorit [Hess, et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7 (1968) 149; ja Holland, et al., *Biochem.* 17 (1978) 4900], kuten enolaasin, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin, heksokinaasin, pyruvaattidekarboksylaasin, fosfofruktokinaasin, glukoosi-
20 6-fosfaatti-isomeraasin, 3-fosfoglyseraattimutaasin, pyruvaattikinaasin, trioosifosfaatti-isomeraasin, fosfoglukoo-
si-isomeraasin ja glukokinaasin promoottorit. Hiivassa tehtävään ilmentämiseen käytettäväksi sopivia vektoreita ja promoottoreja on lisäksi kuvattu julkaisussa R. Hitzeman,
25 et al., EP-hakemusjulkaisussa 73 657.

Edulliset hiivavektorit voidaan koota käyttäen pBR322:sta peräisin olevia DNA-jaksoja *E. coli* tapahtuvaa selektiota ja replikaatiota varten (Amp^r -geeni ja replikaation alkukohta) sekä hiivan DNA-jaksoja, joihin kuuluvat glukoosilla repressoitavissa oleva ADH2-promoottori ja α -tekijän erittymisen johtojakso. ADH2-promoottori on kuvattu julkaisuissa Russel, et al. [*J. Biol. Chem.* 258
30 (1982) 2674] ja Beier, et al., [*Nature* 300 (1982) 724]. Hiivassa toimivaa johtojaksoa koodaava DNA-segmentti liitetään edullisesti toiminnallisesti fuusioproteiinia koodaavan DNA:n 5'-puoleiseen päähän. Jakson koodaama johto-

jaksopeptidi edistää fuusioproteiinin erittymistä solusta ja se pilkkoutuu tavallisesti fuusioproteiinista tämän erittyessä. Yhtenä esimerkkinä voidaan mainita se, että hiivan α -tekijän johtojakso, joka ohjaa heterologisten proteiinien erittymistä, voidaan liittää promoottorin ja ilmennettävän rakennegeenin väliin. Tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Kurjan, et al., Cell 30 (1982) 922; ja Bitter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1984) 5330. Johtojakso voidaan modifioida sellaiseksi, että siinä on lähellä sen 3'-puoleista päätä yksi tai useampi käyttökelpoinen restriktiokohta, joiden tarkoituksena on tehdä johtojakson fuusio vieraisiin geeneihin helpomaksi.

Sopivat hiivan transformaatiomenetelmät ovat tunnettuja alan ammattikokemuksen perusteella. Kuvaavaksi esimerkiksi soveltuva menetelmä on kuvattu julkaisussa Hinnen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1929, jossa menetelmässä Trp^+ -transformantit selektoidaan selektoivassa mediumissa, jonka koostumus on 0,67 % hiivan typpiperusravinnetta (yeast nitrogen base), 0,5 % kasaminohappoja, 2 % glukoosia, 10 μg adeniinia millilitraa kohti ja 20 μg urasiilia millilitraa kohti. Edellä kuvatun ADH2-promoottorin sisältävillä vektoreilla transformoituja isäntäkantoja voidaan kasvattaa niiden ilmentämiseksi rikkaassa mediumissa, jonka koostumus on 1 % hiivauutetta, 2 % peptonia ja 1 % glukoosia ja jota on täydennetty 80 mikrogrammalla adeniinia millilitraa kohti ja 80 mikrogrammalla urasiilia millilitraa kohti. Mediumissa olevan glukoosin loputtua tapahtuu ADH2-promoottorin derepressio. Raakapreparaateiksi saatavat hiivan supernatantit kootaan talteen suodattamalla ja niitä pidetään 4 °C:ssa ennen jatkopuhdistusta.

Yhdistelmä-proteiinin ilmentämiseen voidaan käyttää useita nisäkäs- tai hyönteissoluviljelyjärjestelmiä. Kat-sauksen baculovirusjärjestelmiin heterologisten proteiinien valmistamiseksi hyönteissoluissa ovat esittäneet Luckow ja Summers, Bio/Technology 6 (1988) 47. Voidaan käyttää nisäk-

käistä peräisin olevia vakiintuneita solulinjoja. Esimerkkeihin sopivista nisäkässolulinjoista kuuluvat apinan munuaissolujen COS-7-solulinjat, jotka on kuvattu julkaisussa Gluzman [Cell 23 (1981) 175], L-solut, C127-, 3T3-, kiinanhamsterin munasarja (CHO)-, HeLa- ja BHK-solulinjat. Nisäkäsilmentämisvektorit voivat sisältää yksiköitä, joille ei tapahdu transkriptiota, kuten replikaation alkukohdan, ilmentettävään geeniin liitetyn sopivan promoottorin ja enhancer-jakson sekä muita 5'- tai 3'-puoleisia transkriptioon osallistumattomia vierusjaksoja ja 5'- tai 3'-puoleisia translaatioon osallistumattomia jaksoja, kuten tarvittavat ribosomien sitoutumiskohdat, polyadenylaatiokohta, silmukoinnin luovuttaja- ja akseptorikohdat ja transkription terminaatiojaksot.

Selkärankaissolujen transformoinnissa käytettävissä ilmentämisvektoreissa olevia transkription ja translaation säätelyjaksoja voidaan saada käyttöön virusperäisistä lähtömateriaaleista. Esimerkiksi tavallisesti käytetyt promoottorit ja enhancer-jaksot ovat peräisin polyomasta, adenovirus 2:sta, simian virus 40:sta (SV40) ja humaanisytomegaloviruksesta. SV40-viruksen genomista peräisin olevia DNA-jaksoja, esimerkiksi SV40:n alkukohtaa, varhaista ja myöhäistä promoottoria, enhancer-jaksoa sekä silmukoitus- ja polyadenylaatiokohtia, voidaan käyttää materiaalina, josta saadaan käyttöön muut heterologisen DNA-jakson ilmentämiseen vaaditut geneettiset yksiköt. Varhaiset ja myöhäiset promoottorit ovat erityisen käyttökelpoisia, koska nämä kumpikin on saatavissa helposti viruksesta fragmenttina, joka myös sisältää SV40:n viruksen replikaation alkukohdan [Fiers, et al., Nature 273 (1978) 113]. Voidaan myös käyttää pienempiä tai suurempia SV40:n fragmentteja edellyttäen, että niihin sisältyy noin 250 ep:n suuruinen jakso, joka ulottuu Hind III -kohdasta viruksen replikaation alkukohdassa sijaitsevan BglI-kohdan suuntaan. Esimerkkeinä olevia vektoreita voidaan konstruoida julkaisussa Okayama ja Berg [Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 280] kuvatulla tavalla.

Käyttökelpoinen järjestelmä nisäkkäiden reseptori-cDNA-molekyylien ilmentämiseksi pysyvästi voimakkaasti ilmennettyinä hiiren C127-rintarauhasepiteelisoluissa voidaan konstruoida olennaisesti julkaisussa Cosman, et al. [Mol. Immunol. 23 (1986) 935] kuvatulla tavalla.

Fuusioproteiinin valmistaminen ja puhdistus

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön menetelmä tässä kuvatun yhdistelmä-fuusioproteiinin valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää sen, että mainittua fuusioproteiinia koodaavan DNA-jakson sisältävällä ilmentämisvektorilla transformoitua isäntäsolua viljellään olosuhteissa, joissa fuusioproteiinin on mahdollista ilmentyä, joka fuusioproteiini puhdistetaan sitten soluviljelymediumeista tai solutuotteista. Voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa puhdistusmenetelmää ja paras menetelmä vaihtelee sellaisten tekijöiden mukaan, joita ovat isäntäsolujen tyyppi ja se, erittyykö haluttu proteiini isäntäsoluista vai ei. Fuusioproteiini erittyy soluviljelymediumiin silloin, kun se heti muodostuttuaan on fuusioituneena isäntäsoluissa toimintakykyiseen signaalijaksoon tai johtopeptidiin, tai silloin, kun proteiini sisältää TNF-R- ja IL-1R-polypeptidien liukoisia muotoja.

Yhdistelmäproteiinia soluviljelymediumiin erittävistä ilmentämisjärjestelmistä peräisin olevat supernatantit voidaan esimerkiksi aluksi konsentroida käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa proteiinien konsentroitisuodatinta, esimerkiksi Amicon- tai Millipore Pellicon -ultra-suodatusyksikköä. Konsentraatiovaiheen jälkeen konsentraattia voidaan käsitellä sopivalla puhdistusmatriksilla. Sopiva affiniteettimatriksi voi esimerkiksi sisältää TNF:ää tai IL-1:tä. Affiniteettimatriksi voidaan valmistaa yhdistämällä yhdistelmä-humaani-TNF tai -IL-1 syanogeenibromidilla aktivoituun Sepharoseen (Pharmacia) tai Hydrazide Affigel'iin (Biorad) valmistajien suosittelemilla tavoilla. Edullinen puhdistusmenetelmä sisältää vaiheittaisen immunologisen puhdistuksen käyttäen sopivaan tukiaineeseen sidot-

tuja vasta-aineita. Proteiinit, jotka sitoutuvat TNF-R:lle spesifiseen vasta-aineeseen, otetaan talteen ja saatetaan kosketukseen liukenemattoman kantaja-aineen pinnalla olevan IL-1R:lle spesifisen vasta-aineen kanssa. Molempien vasta-

5 aineiden kanssa immunologisesti reagoivat proteiinit voidaan siten tunnistaa ja eristää. Tyypin I humaani-IL-1R:lle spesifinen monoklonaalinen vasta-aine on talletettu 13.9.1990 talletuslaitokseen American Type Culture Collec-

10 tion hakunumerolla HB 10 556. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää anioninvaihtohartsia, esimerkiksi matriksia tai alustaa, jossa on ulospäin suuntautuvia dietyyliaminoetyyli (DEAE) -ryhmiä. Matriksit voivat olla akryyliamidia, agarosia, dekstraania, selluloosaa tai proteiinien puhdistamisessa tavallisesti käytettyjä muita matriksityyppejä.

15 Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kationinvaihtovaihetta. Sopiviin kationinvaihtimiin kuuluvat useat erilaiset liukenemattomat matriksit, jotka sisältävät sulfopropyylitai karboksimeetyyliryhmiä. Edullisia ovat sulfopropyyliryhmät. Fuusioproteiinikoostumuksen jatkopuhdistukseen voidaan

20 käyttää yhtä tai useampaa korkean suorituskyvyn käänteisfaasinestekromatografia (RP-HPLC) -vaihetta, joissa käytetään hydrofobisia RP-HPLC-mediumeja, esimerkiksi silikageeliä, jossa on rungosta poispäin suuntautuvia metyyliiryhmiä tai muita alifaattisia ryhmiä.

25 Bakteeriviljelmässä tuotettu yhdistelmäproteiini eristetään tavallisesti suorittamalla ensin uutto solunapeista, jonka jälkeen suoritetaan yksi tai useampi vaihe, joihin kuuluvat konsentointi, ulossuolaus ja vesipitoisessa mediumissa suoritettu ioninvaihto- tai geeli- (size

30 exclusion) kromatografia. Viimeisinä puhdistusvaiheina voidaan lopuksi käyttää korkean suorituskyvyn nestekromatografiaa (HPLC). Yhdistelmäfuusioproteiinien ilmentämiseen käytetyt mikrobisolut voidaan hajottaa millä tahansa käyttökelpoisella menetelmällä, mukaan lukien toistetut jäädytys-sulatus-käsittelyt, ultraäänikäsittely, mekaaninen ha-

35 jotus tai soluja hajottavien aineiden käyttö.

Puhdistusta yksinkertaistaa huomattavasti sellaisen hiivan fermentaatio, joka ilmentää fuusioproteiineja erittyvänä proteiinina. Suurimittakaavaisesta fermentaatiosta saatu eritetty yhdistelmä-proteiini voidaan puhdistaa menetelmillä, jotka ovat analogiset julkaisussa Urdal, et al. [J. Chromatog. 296 (1984) 171] kuvattujen menetelmien suhteen ja joihin sisältyy kaksi peräkkäistä käänteisfaasi-HPLC-vaihetta yhdistelmäproteiinin puhdistamiseksi preparatiivisessa HPLC-pylväässä.

10 Joitakin edellä olevia puhdistusvaiheita tai niitä kaikkia voidaan käyttää useina erilaisina yhdistelminä olennaisesti homogeenisen yhdistelmäproteiinin aikaansaamiseksi. Yhdistelmäsoluviljelmän avulla on mahdollista valmistaa fuusioproteiinia, jossa ei ole niitä kontaminoivia
15 proteiineja, jotka tavallisesti liittyisivät TNF-R:ään tai IL-1R:ään sellaisina kuin ne esiintyvät luonnossa niiden omaa alkuperää edustavissa lajeissa, esimerkiksi soluissa, solueksudaateissa tai ruumiinnesteissä. Edellä olevat puhdistusmenetelmät kuuluvat myöskin niihin menetelmiin, joita
20 voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten ei-yhdistelmäreseptorien puhdistamiseen.

Vaihtoehtona reseptorien valmistamiselle fuusioproteiineina voidaan TNF-R- ja IL-1R-proteiinit valmistaa ja puhdistaa erikseen ja kytkeä yhteen myöhemmin. Tunnetaan
25 useita reagensseja, jotka ovat käyttökelpoisia yhden proteiinimolekyylin silloittamiseksi toiseen proteiinimolekyylin. Tähän tarkoitukseen on käytettävissä heterobifunktionaalisia ja homobifunktionaalisia kytkijämolekyyliä, joita on saatavilla esimerkiksi yhtiöstä Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois. Tällaisissa kytkijäjaksoissa on kaksi
30 funktionaalista ryhmää (esimerkiksi estereitä ja/maleimidejä), jotka reagoivat tiettyjen aminohapposivuketjujen funktionaalisten ryhmien kanssa (esimerkiksi lysiiniryhmissä olevien amiinien ja kysteeniryhmiin pelkistämällä muodostettujen sulfhydryylien kanssa), mikä siten liittää toisen polypeptidin toiseen. Esimerkkejä tällaisista silloi-
35

tusreagensseista ovat N-maleimidobentsoyylisukkinimidyyli-
 esteri ja N-hydroksisukkinimidi. Reagenssi ja reaktio-olo-
 suhteet on valittava sellaisiksi, että silloittaminen ei
 häiritse TNF:n tai IL-1:n sitoutumista reseptoriin. TNF-R-
 ja IL-1R-polypeptidit kytketään edullisesti yhdellä edellä
 5 kuvatuista peptidikytkijäjaksoista, joka toimii loitonta-
 jana. Peptidikytkijäjakso voidaan liittää TNF-R:ään tai IL-
 1R:ään millä tahansa tavanomaisista menetelmistä, joita on
 käytetty yhden polypeptidin liittämiseksi toiseen. Edellä
 10 kuvatut Pierce Chemical Company -yhtiöstä saatavilla olevat
 silloitusreagenssit kuuluvat niihin reagensseihin, joiden
 käyttö voi tulla kysymykseen. Peptidikytkijäjaksoon, esi-
 merkiksi tämän terminaalisiin päihin, voidaan liittää ami-
 nohappoja, joissa on tällaisten reagenssien kanssa reagoi-
 15 maan kykeneviä sivuketjuja.

Farmaseuttiset koostumukset

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön menetelmä farma-
 seuttisten koostumusten valmistamiseksi, jotka sisältävät
 mitä tahansa edellä kuvattua fuusioproteiinia ja fysiologi-
 20 sesti hyväksyttävää kantaja-ainetta, laimenninta tai lisä-
 ainetta. Tällaiset kantaja-aineet, lisäaineet ja laimen-
 timet ovat käytetyissä annoksissa ja konsentraatioissa ei-
 toksisia potilaille, joille niitä annetaan. Tällaiset koos-
 tumukset voivat sisältää puskureita, antioksidanteja, ku-
 25 ten askorbiinihappoa, polypeptidejä, joiden suhteellinen
 moolimassa on pieni (alle noin 10 ryhmää), proteiineja,
 aminohappoja, hiilihydraatteja, joihin kuuluvat glukoosi,
 sakkaroosi tai dekstriinit, kelatoivia aineita, kuten
 EDTA:ta, glutationia sekä muita stabilointiaineita ja lisä-
 30 aineita. Esimerkkejä asiaankuuluvista laimentimista ovat
 neutraali puskuroitu fysiologinen suolaliuos tai fysio-
 loginen suolaliuos, johon on yhdistetty saman lajin yksi-
 löistä valmistettua seerumialbumiinia. Koostumus formuloi-
 daan edullisesti lyofilisaatiksi käyttäen laimentimina
 35 asiaankuuluvia lisäaineliuoksia (esimerkiksi sakkaroosia).
 Asianmukaiset annokset voidaan määrittää kliinisissä ko-

keissa. Annoksen määrä ja antokertojen tiheys on luonnollisesti riippuvainen sellaisista tekijöistä kuten hoidettavan indikaation vakavuus, haluttu vaste, potilaan terveydentila ja niin edelleen.

5 Sairaustiloja, joissa TNF:llä tai IL-1:llä on osuutta, voidaan hoitaa antamalla terapeuttisesti tehokas määrä farmaseuttisen koostumuksen muodossa olevaa tämän keksinnön mukaista fuusioproteiinia potilaalle, jolla on tällainen sairaus. TNF:llä tai IL-1:llä sanotaan olevan
10 osuutta sairaudessa silloin, kun TNF tai IL-1 aiheuttaa (suoraan tai epäsuorasti) sairauden tai pahentaa sitä. Liu-koisia reseptoriproteiineja voidaan käyttää sitoutumaan kompetitiivisesti TNF:ään tai IL-1:ään, mikä siten inhiboi TNF:n ja IL-1:n sitoutumista solun pinnan reseptoreihin.

15 Terapeuttista käyttöä varten annetaan tämän keksinnön mukaisia puhdistettuja fuusioproteiineja potilaalle, joka on edullisesti ihminen, indikaation suhteen asiaan-kuuluvalla tavalla annettavaa hoitoa varten. Siten farma-seuttisia koostumuksia voidaan esimerkiksi antaa boli-in-
20 jektiona, jatkuvana infuusiona, antamalla niiden vapautua jatkuvasti implanteista tai käyttäen jotakin muuta sopivaa menetelmää.

Farmaseuttisissa koostumuksissa käytetyn fuusiopro-
25 teiinin on oltava puhdistettua siinä mielessä, että fuusio-
proteiini ei sisällä olennaisesti mitään muita alunperin luontaisia tai endogeenisiä proteiineja ja se sisältää alle noin 1 massa-% tuotantomenetelmistä jäljelle jääneitä pro-
30 teiinikontaminantteja. Tällaiset koostumukset voivat kui-
tenkin sisältää muita proteiineja, joita on lisätty sta-
bilointiaineiksi, kantaja-aineiksi, lisäaineiksi tai saman-
aikaisesti käytettäviksi terapeuttisiksi aineiksi. Fuusio-
proteiini on puhdistettu olennaisesti homogeeniseksi, jos se on havaittavissa yhtenä proteiinivyöhykkeenä polyakryy-
liamidigeelissä hopeavärjäyksellä.

35 Tässä kuvattuja fuusioproteiineja voidaan antaa sellaista sairaustilojen hoitamiseksi, joissa TNF:llä ar-

vellaan olevan ainakin osittaisesti osuutta, joita sairaus-tiloja ovat kakeksia, reumaattinen niveltulehdus, diabetes, multippeliskleroosi, keuhkofibroosi ja silikoosi sekä aivomalaria, sekä allograftin ja ksenograftin hyljintä käänteishyljinnässä. On myös viitteitä siitä, että TNF:llä on osuutta sepsiksessä ja septisessä sokissa. Bakteerien endotoksiini voi aiheuttaa sepsiksen tiettyntyyppisten bakteeriden infektoimissa nisäkkäissä ja sen arvellaan stimuloivan makrofageja tuottamaan tekijöitä, joihin sisältyy TNF.

10 Folks, et al. [PNAS USA 86 (1989) 2365], ovat ehdottaneet, että TNF- α :lla on tärkeä osuus HIV-infektion patogeenisissä. TNF- α :n indusoimaa HIV:n ilmentymistä solulinjassa käytetään mallina HIV:n latenssista sen tutkimiseksi, miten latentti infektio muuttuu produktiiviseksi infektioksi.

15 Tietyt sytokiinit (IL-1, IL-2 ja muut pesäkestimulaatiotekijät) voivat indusoida isännän tuottamaan merkittäviä määriä TNF:ää. Kaavan TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R mukaisia fuusioproteiineja voidaan käyttää sytokiiniterapiaan liittyvien sivuvaikutusten hoitoon. Sen tärkeän osuuden

20 johdosta, joka IL-1:llä on TNF:n muodostumisessa, voivat sekä IL-1-reseptor(e)i(t)a että TNF-reseptor(e)i(t)a sisältävät fuusioproteiinit olla edullisia TNF:ään liittyvien kliinisten indikaatioiden hoidossa.

25 TNF:n on raportoitu indusoivan IL-1:n erittymistä in vivo -olosuhteissa. Siten IL-1:n välityksellä tapahtuvien sairaustilojen hoitamisessa voidaan käyttää fuusioproteiineja, jotka sitovat sekä TNF:ää että IL-1:tä. Tämän keksinnön mukaisia fuusioproteiineja voidaan antaa esimerkiksi ihmisessä esiintyvien immuunivasteiden ehkäisemistarkoituksessa. Alloantigeenia vastaan muodostunut immuunivaste aiheuttaa useita erilaisia sairauksia tai sairaus-tiloja. IL-1R estää alloantigeenin aiheuttamissa immuunivasteissa lymfoproliferaatiota ja tulehdusta, jotka ovat seurausta T-solujen aktivoitumisesta. IL-1R:ää voidaan si-

30 ten käyttää estämään alloantigeenin aikaansaamia immuunivasteita esimerkiksi allograftien (kuten iho-, munuais- ja

35

sydänsiirteet) hyljinnän ja luuydinsiirtopotilaiden käänteishyljintäreaktioiden kliinisessä hoidossa. IL-1:lla arvellaan olevan tautia aiheuttava osuus allergioissa ja autoimmuunisissa toimintahäiriöissä (kuten reumaattinen nivel-tulehdus, diabetes ja multippeliskleroosi, jotka ovat riippuvaisia T-solujen aktivaatiosta niitä antigeenejä vastaan, joita järjestelmä ei tunnista isännän omiksi antigeeneiksi.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

TNF:llä ja IL-1:llä on osuutta useissa samantyyppisissä sairauksissa, mikä voidaan nähdä vertaamalla edellä esitettyjä luetteloita TNF:n välityksellä ja IL-1:n välityksellä syntyvistä sairauksista. Lisäksi TNF ja IL-1 ovat kaksi tärkeimpiin tulehduksen välittäjäaineisiin kuuluvaa molekyyliä, jotka vaikuttavat usein yhdessä toimien. Tämän keksinnön mukaisten fuusioproteiinien, jotka sisältävät sekä TNF:n että IL-1:n reseptoreita, käytöstä saadaan siten etuja monien sellaisten sairauksien hoidossa, joissa sekä TNF:llä että IL-1:llä arvellaan olevan osuutta taudin syntymisessä.

20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Tiettyihin sovellutuksiin on tässä kuvatuissa fuusioproteiineissa edullista käyttää IL-1R:n ja TNF-R:n liukoisia muotoja. Proteiinien puhdistus yhdistelmäisäntäsoluista helpottuu, koska liukoiset proteiinit erittyvät soluista. Lisäksi liukoiset proteiinit soveltuvat tavallisesti paremmin annosteltavaksi suonensisäisesti ja niillä voi olla terapeuttista vaikutusta (IL-1:n ja/tai TNF:n sitominen) kiertävässä veressä. Liukoiset fuusioproteiinit estävät IL-1:tä ja/tai TNF:ää sitomalla signaalin välittymistä solun pinnalla olevien endogeenisten IL-1:n tai TNF:n reseptorien välityksellä.

30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Tässä kuvattuja fuusioproteiineja voidaan myös käyttää reagensseina reseptoriin perustuvissa immunomäärityksissä, reagensseina TNF- tai IL-1-määrityksissä tai sitovina aineina TNF:n tai IL-1:n affiniteettipuhdistuksessa.

Seuraavat esimerkit on esitetty tämän keksinnön kuvaamiseksi eivätkä ne ole tarkoitettu sitä millään tavoin rajoittaviksi.

Esimerkit

5

Esimerkki 1

TNF:n sitoutumismääritykset

A. TNF α :n ja TNF β :n varustaminen radioaktiivisella leimalla.

Yhdistelmä-humaani-TNF α :aa, joka oli sellaisen fuusioproteiinin muodossa, joka sisälsi N-terminaaliossa olevan hydrofiilisen oktapeptidin, ilmennettiin erittyvänä proteiinina hiivassa ja se puhdistettiin affiniteettikromatografialla [Hopp, et al., Bio/Technology 6 (1988) 1204]. Puhdistettu yhdistelmä-humaani-TNF β hankittiin yhtiöstä R&D Systems (Minneapolis, MN). Kumpikin proteiini varustettiin radioaktiivisella leimalla käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa kiinteän faasin reagenssia, Iodo-Gen'ia (Pierce). Tässä menetelmässä pipetoitiin 5 μ g Iodo-Gen'ia lasista valmistetun 10 x 75 mm:n suuruisen koeputken pohjalle ja tätä inkuboitiin 20 minuuttia 4 °C:ssa seoksen kanssa, jonka määrä oli 75 μ l ja jonka koostumus oli 0,1 M natriumfosfaatti, pH 7,4 ja 20 μ l (2 mCi) Na¹²⁵I. Tämän jälkeen tämä liuos pipetoitiin toiseen lasista valmistettuun koeputkeen, joka sisälsi 5 μ g TNF α :aa (tai TNF β :ää) 45 μ l:ssa PBS:ää, ja sitä käsiteltiin 20 minuutin ajan 4 °C:ssa. Reaktioseos fraktioitiin geelisuodatuksella, joka suoritettiin pakatulalta tilavuudeltaan 2 ml:n suuruisessa Sephadex G-25:ssa (Sigma), joka oli tasapainotettu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 -mediumissa, joka sisälsi 2,5 % (w/v) naudan seerumialbumiinia (BSA), 0,2 % (w/v) natriumatsidia ja 20 millimolaarista Hepes'tä, ja jonka pH oli 7,4 (sitoutumismedium). Lopulliset yhdistetyt ¹²⁵I-TNF-jakeet laimennettiin sitoutumismediumiin käyttökantaliuokseksi, jonka konsentraatio oli 1 x 10⁻⁷ M ja jota säilytettiin korkeintaan yhden kuukauden ajan 4 °C:ssa ilman havaittavaa reseptoria sitovan aktiivisuuden

häviämistä. Spesifinen aktiivisuus rutiinipreparaateissa on 1×10^6 cpm/mmol TNF:ää.

B. Sitoutuminen kokonaisiin soluihin

Kokonaisilla soluilla tehdyt sitoutumismääritykset suoritettiin kahdella menetelmällä. Ensimmäisessä menetelmässä soluja kasvatettiin ensin joko suspensiossa (esimerkiksi U937) tai antamalla niiden kiinnittyä kudosisviljelymaljoihin (esimerkiksi yhdistelmä-TNF-reseptoria ilmentävät WI26-VA4- tai COS-solut). Kiinnittyneet solut poistettiin myöhemmin 37 °C:ssa 10 minuuttia kestäväällä EDTA-käsittelyllä, jossa EDTA:n konsentraatio oli 5 mM. Tämän jälkeen suoritettiin sitoutumismääritykset käyttäen ftalaattiöljy-erotusmenetelmää [Dower, et al., J. Immunol. 132 (1984) 751] olennaisesti julkaisussa Park, et al. [J. Biol. Chem. 261 (1986) 4177] kuvatulla tavalla. ^{125}I -TNF:n epäspesifinen sitoutuminen määritettiin siten, että määrityksessä oli 200-kertainen tai suurempi mooliylimäärä leimalla varustamatonta TNF:ää. Sitoutumismäärityksessä käytettiin natriumatsidia (0,2 %) inhiboimaan ^{125}I -TNF:n sisäänottoa soluihin. Toisessa menetelmässä tutkittiin sellaisten COS-solujen, jotka oli transfektoitu TNF-R:ää sisältävällä plasmidilla ja jotka ilmentävät TNF-reseptoreita pinnallaan, kykyä sitoa ^{125}I -TNF:ää käyttäen julkaisussa Sims, et al. [Science 241 (1988) 585] kuvattua maljoilla tehtävää sitoutumismääritystä.

C. Kiinteän faasin sitoutumismääritykset

TNF-R:n kyvystä adsorboitua pysyvästi nitroselluloosaan humaanisolujen detergenttiuutteista ja säilyttää kuitenkin TNF:ää sitova aktiivisuus saatiin käyttöön keino TNF-R:n havaitsemiseksi. Valmistettiin solu-uutteet yhdistämällä solunappi kaksi kertaa omaan tilavuuteensa PBS:ää, joka sisälsi 1 % Triton X-100:aa ja proteaasi-inhibiittoriseosta (2 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridi, 10 μM pepstatiini, 10 μM leupeptiini, 2 mM o-fenantroliini ja 2 mM EGTA), seosta samalla voimakkaasti pyörresekoittaen. Seosta inkuboitiin jäissä 30 minuuttia, minkä jälkeen se sentri-

fugoitiin 12 000 x g:n voimalla 15 minuuttia 8 °C:ssa tumien ja muun jätteen poistamiseksi. Kahden mikrolitran suuruisia eriä solu-utatteita pipetoitiin kuivien BA8521-nitroselluloosamembraanien (Schleicher and Schuell, Keene, NH) pinnalle ja niiden annettiin kuivua. Membraaneja inkuboitiin kudosviljelymaljoilla 30 minuuttia Tris:lla (0,05 M) puskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa (0,15 M), jonka pH oli 7,5 ja joka sisälsi 3 % w/v BSA:ta epäspesifisten sitoutumiskohtien tekemiseksi reagoimattomiksi. Tämän jälkeen membraanin päälle pipetoitiin seos, joka sisälsi 5×10^{-11} -molaartista ^{125}I -TNF:ää PBS:n sekä 3-%:isen BSA:n seoksessa, ja seosta inkuboitiin 2 tuntia 4 °C:ssa sitä samalla ravistellen. Tämän vaiheen lopussa membraanit pestiin 3 kertaa PBS:ssä, kuivattiin ja asetettiin Kodak X-Omat AR -filmille 18 tunnin ajaksi -70 °C:seen.

D. Signaalinvälittymismääritykset

TNF-signaalin välittymisen inhibiatioaktiivisuus voidaan määrittää transfektoimalla solut yhdistelmä-TNF-R-DNA-molekyyleillä, jotka koodaavat membraaniin sitoutunutta TNF-R:ää, solun pinnalla esiintyvän yhdistelmä-reseptorin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Solut saatetaan sitten kosketukseen TNF:n kanssa ja tuloksena olevat metaboliset vaikutukset tutkitaan. Jos saadaan vaikutus, jonka on katsottava johtuvan ligandin toiminnasta eikä sen ole katsottava johtuvan soluissa endogeenisena olevien TNF-reseptorien vaikutuksesta, niin yhdistelmä-reseptorilla on signaalia välittävää aktiivisuutta. Kuvaavia esimerkkejä menetelmistä sen määrittämiseksi, onko polypeptidillä signaalia välittävää aktiivisuutta, on kuvattu julkaisuissa Idzerda, et al., J. Exp. Med. 171 (1990) 861; Curtis, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3045; Prywes, et al., EMBO J. 5 (1986) 2179 ja Chou, et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 1842. Liukoisen TNF-R-polypeptidin kyky inhiboida kompetitiivisesti signaalin välittymistä voidaan määrittää samantlaisia menetelmiä käyttäen. Primäärisiä soluja tai solulinjoja, jotka ilmentävät endogeenista TNF-reseptoria ja

joilla on havaittava biologinen vaste TNF:ää kohtaan, voitaisiin käyttää vaihtoehtona membraanin sitoutunutta yhdistelmä-TNF-R:ää ilmentävien solujen käytölle. Signaalin välittymisen pienentyminen lisättäessä määritykseen liukoista TNF-R-polyeptidiä viittaa siihen, että liukoinen TNF-R sitoo TNF:ää, joten pienempi määrä TNF:ää sitoutuu solun pinnan TNF-reseptoreihin signaalin välittymisen aloittamiseksi.

Esimerkki 2

10

IL-1:n sitoutumismääritykset

A. rIL-1 β :n varustaminen radioaktiivisella leimalla

15

Yhdistelmä-humaani-IL-1 β :aa valmistettiin ilmentämällä *E. coli*ssa ja puhdistamalla se homogeeniseksi julkaisussa Kronheim, et al. [Bio/Technology 4 (1986) 1078] kuvatulla tavalla. IL-1 β varustettiin leimalla käyttäen Boltonin ja Hunterin di-jodi(¹²⁵I)-reagenssia (New England Nuclear, Glenolden, PA). Kymmenen mikrogrammaa (0,57 nmol) proteiinia 10 μ l:ssa fosfaatilla (0,015 mol/l) puskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS; 0,15 mol/l), jonka pH oli 7,2, yhdistettiin 10 μ l:aan natriumboraatilla (0,1 mol/l) puskuroitua fysiologista suolaliuosta (0,15 mol/l), jonka pH oli 8,5, ja tämä saatettiin reagoimaan Boltonin ja Hunterin reagenssin kanssa, jonka konsentraatio oli 1 mCi (0,23 nmol), 12 tunnin ajan 8 °C:ssa valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tämän jälkeen seokseen lisättiin 30 μ l 2-prosenttista gelatiinia ja 5 μ l glysiinietyyliesteriä, jonka konsentraatio oli 1 mol/l, ja proteiini erotettiin reagoimattomasta Boltonin ja Hunterin reagenssista BiogelTM P6-pylväessä (Biorad Laboratories, Richmond, CA), jonka pakattu tilavuus oli 1 ml. Leiman havaittiin rutiinilyössä liittyvän 50 - 60-%:sesti. Radioaktiivisella jodilla varustamisessa saavutetut spesifiset aktiivisuudet olivat alueella $1 \times 10^{15} - 5 \times 10^{15}$ cpm/nmol-l (0,4 - 2 atomia I:tä proteiinimolekyyliä kohti) ja natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS/PAGE) tuli esille yksi leimalla varustettu polypeptidi, joka oli kool-

20

25

30

35

taan 17,5 kD, mikä oli yhdenmukainen tulos IL-1:lle aikai-
semmin raportoitujen arvojen suhteen. Leimalla varustettu
proteiini oli saostettavissa yli 98-%:sesti TCA:lla, mikä
viittasi siihen, että ^{125}I oli sitoutunut kovalenttisesti
5 proteiiniin.

B. Membraaniin sitoutuneen IL-1R:n sitoutumisinhi- bitiomääritykset

"IL-1" tarkoittaa yhteisesti IL-1 α :aa ja IL-1 β :aa.
Inhibitiovakio IL-1R-proteiinin sitoutumiselle voidaan mää-
10 rittää sitoutumisinhibitomäärityksillä, joissa käytetään
kilpailevan molekyylin (IL-1 β :n tai IL-1 α :n) vaihtelevia
konsentraatioita, joita molekyyliä inkuboidaan seoksessa,
jossa on vakiomäärä radioaktiivisella leimalla varustettua
IL-1 β :aa tai IL-1 α :aa ja IL-1R:ää ilmentävä soluja. Kilpai-
15 leva yhdiste, jota ei ole varustettu radioaktiivisella
leimalla, sitoutuu reseptoriin ja estää radioaktiivisella
leimalla varustetun ligandin sitoutumisen reseptoriin. Si-
toutumismääritykset suoritettiin käyttäen ftalaattiöljy-
erotusmenetelmää olennaisesti julkaisuissa Dower, et al.,
20 J. Immunol. 132 (1984) 751 ja Park, et al., J. Biol. Chem.
261 (1986) 4177 kuvatulla tavalla. Tämä tehtiin pääpiir-
teittäin siten, että membraaniin sitoutunutta yhdistelmä-
IL-1R:ää ilmentäviä isäntäsoluja inkuboitiin kuusikuoppai-
silla levyillä (Costar, Cambridge, MA) 4 °C:ssa kaksi tun-
25 tia käyttäen ^{125}I -IL-1 β :aa 1 ml:ssa sitoutumismediumia
[Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 -medium, johon
oli yhdistetty 2 % BSA:ta, Hepes-puskuria, jonka konsen-
traatio oli 20 mM ja 0,1 % natriumatsidia, ja jonka pH oli
7,2]. Seokseen oli lisätty natriumatsidia, joka oli tarkoi-
30 tettu inhiboimaan ^{125}I -IL-1:n joutumisen solujen sisään ja
sen pilkkoutuminen soluissa 37 °C:ssa. Levyjä inkuboitiin
pöytäravistelijaissa 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Rinnakkaiset
erät inkubointiseosta pipetoitiin tämän jälkeen polyeteen-
nistä valmistettuihin sentrifugiputkiin, jotka sisälsivät
35 ftalaattiöljyseosta, joka sisälsi 1,5 osaa dibutyylifita-
laattia yhdistettynä yhteen osaan bis(s-etyyliheksyyli)-

ftalaattia. Käytettiin myös kontrollikoeputkia, jotka epä-
 spesifisen sitoutumisen määrittämiseksi sisälsivät sataker-
 taisen mooliylimäärän leimalla varustamatonta IL-1 β :ää. Si-
 toutunutta ¹²⁵I-IL-1:tä sisältävät solut erotettiin sitoutu-
 5 mattomasta ¹²⁵I-IL-1:stä sentrifugoimalla seoksia 5 minuut-
 tia 15 000 x g:n voimalla Eppendorf Microfuge'ssa. Soluihin
 liittynyt radioaktiivisuus määritettiin sitten gammalaski-
 jalla.

C. Liukoisen IL-1R:n sitoutumisinhibitiomääritys

10 Inhibitiovakio liukoisen humaani-IL-1R:n sitoutumi-
 selle voidaan määrittää sitoutumisinhibitiomäärityksellä,
 jossa käytetään vaihtelevia konsentraatiota IL-1 β :n kanssa
 kilpailevaa yhdistettä, joita inkuboidaan seoksessa, jossa
 on vakiomäärä radioaktiivisella leimalla varustettua I-IL-
 15 1 β :aa ja tyyppin II IL-1R:ää ilmentäviä CB23-soluja (Ep-
 stein-Barrin viruksella transformoitu napaveren B-lymfo-
 syyttisolulinja). Määrityksissä, joihin liittyy liukoisen
 tyyppin I IL-1R:n käyttö, voidaan CB23-solujen tilalla käyt-
 tää endogeenisiä tyyppin I IL-1-reseptoreita ilmentävää so-
 20 lulinjaa. Sitoutumismääritykset suoritettiin käyttäen fta-
 laattiöljyerotusmenetelmää olennaisesti julkaisuissa Dower,
 et al., J. Immunol. 132 (1984) 751 ja Park, et al., J.
 Biol. Chem. 261 (1986) 4177 kuvatulla tavalla. Tämä tehtiin
 pääpiirteittäin siten, että CVI-EBNA (nisäkäs) -solut
 25 transfektoitiin esimerkissä 10 kuvatulla tavalla ilmentä-
 misvektorilla pDC406, joka sisälsi liukoista tyyppin II hu-
 maani-IL-1R:ää koodaavaa cDNA:ta. Soluista saadut super-
 natantit koottiin talteen kolme päivää transfektion jälkeen
 ja niistä tehtiin sarjalaimennokset sitoutumismediumiin
 30 [Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 -medium, joka
 sisälsi 2 % BSA:ta, Hepes-puskuria, jonka konsentraatio oli
 20 mM, ja 0,2 % natriumatsidia ja jonka pH oli 7,2]
 6-kuoppaisissa levyissä 50 μ l:n tilavuuteen kuoppaa kohti.
 Supernatantteja sekä 50 μ l:n eriä seosta, joka sisälsi 9 x
 35 10⁻¹⁰ -molaarista ¹²⁵I-IL-1 β :aa sekä 2,5 x 10⁶ CB23-solua,
 inkuboitiin 8 °C:ssa 2 tuntia seosta samalla ravistellen.

Kahdet rinnakkaiset 60 µl:n suuruiset erät inkubointiseoksia pipetoitiin sitten polyeteenistä valmistettyihin sentrifugipytkiin, joissa oli 1,5 osaa dibutyyli-ftalaattia ja 1 osa bis(s-etyyliheksyyli)ftalaattia sisältävää ftalaattiöljyseosta. Sarjassa käytettiin myös negatiivista kontrollikoeputkea, joka sisälsi epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseksi (100-%:inen inhibitio) leimalla varustettua IL-1β:ää, jonka konsentraatio oli 3×10^{-6} M, ja kontrollikoeputkea, joka maksimaalisen sitoutumisen määrittämiseksi sisälsi 50 ml sitoutumismediumia, jossa oli ainoastaan radioaktiivisella leimalla varustettua IL-1β:aa. Sitoutunutta 125 I-IL-1β:aa sisältävät solut erotettiin sitoutumattomasta 125 I-IL-1β:sta sentrifugoimalla seoksia 5 minuuttia 15 000 x g:n voimalla Eppendorf Microfuge'ssa. Supernatantit, jotka sisälsivät soluihin sitoutumatonta 125 I-IL-1β:aa, heitettiin pois ja solut huuhdottiin varovasti jääkylmällä sitoutumismediumilla. Soluja inkuboitiin seoksessa, joka sisälsi 1 ml trypsiinin ja EDTA:n seosta, 37 °C:ssa 15 minuuttia ja ne koottiin sitten talteen. Soluihin liittynyt radioaktiivisuus määritettiin sitten gammalaskijalla. Liukoisen IL-1R:n kyky inhiboida IL-1α:n sitoutumista endogeenisiin solureseptoreihin voidaan määrittää samalla menetelmällä. Analogisia menetelmiä voidaan käyttää määrityksissä, joihin liittyy liukoisen TNF-R:n käyttö.

Esimerkki 3

Humaani-TNF-R-cDNA:n eristys ilmentämällä aktiivista proteiinia suoraan COS-7-soluissa

TNF-R:n ilmentymistä koskeva seulonta suoritettiin useille erilaisille humaanisolulinjoille käyttäen perusteenä niiden kykyä sitoa 125 I-leimalla varustettua TNF:ää. WI-26VA4 -humaanifibroblastisolulinjan (ATCC CCL 95.1) havaittiin ilmentävän kohtalaisen määrän reseptoreja solua kohti. Tasapainotilassa tehdyt sitoutumistutkimukset osoittivat, että 125 I-TNF:n sitoutuminen solulinjassa oli kaksivaiheista ja se käsitti noin 4 000 korkea-affiniteettista kohtaa

($K_a = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$) ja 15 000 matala-affiniteettista kohtaa ($K_a = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) solua kohti.

Valmistettiin koon suhteen jaottelematon cDNA-kirjasto käyttäen sellaisesta totaali-RNA:sta eristetyn polyadenyloidun mRNA:n käänteistranskriptiota, joka oli uutettu kermesmarjan mitogeenin läsnä ollessa kasvatetuista WI-26 VA4 -humaanifibroblastisolusta vakiomenetelmiä käyttäen [Gubler, et al., *Gene* 25 (1983) 263; Ausubel, et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 1, (1987)]. Solut koottiin talteen hajottamalla solut guanidiinihydrokloridiliuoksessa ja kokonais-RNA eristettiin aiemmin kuvulla tavalla [March, et al., *Nature* 315 (1985) 641].

Poly-A⁺-RNA eristettiin oligo-dT-selluloosakromatografiolla ja kaksinauhainen cDNA valmistettiin menetelmällä, joka oli samanlainen kuin julkaisussa Gubler ja Hoffman [Gene 25 (1983) 263] kuvattu menetelmä. Tämä tapahtui pääpiirteittäin siten, että poly-A⁺-RNA muunnettiin RNA-cDNA-hybridiksi käänteistranskriptaasilla käyttäen alukkeena oligo-dT:tä. Tämän jälkeen RNA-cDNA-hybridi muunnettiin kaksinauhaiseksi cDNA:ksi käyttäen RNAasi H:ta yhdessä DNA-polymeraasi I:n kanssa. Tulokseksi saadun kaksinauhaisen cDNA:n päät tasoitettiin käyttäen T4:n DNA-polymeraasia. Päistään tasoitettuun cDNA:han lisättiin EcoRI-kytkijäjaksoadapterit (nämä sisälsivät sisäiset NotI-kohdat), jotka fosforyloitiin ainoastaan toisesta päästä (Invitrogen). Kytkijä-adapterijaksot sisältävä cDNA käsiteltiin T4:n polynukleotidikinaasilla kytkijä-adapterijakson 5'-puoleisen vapaaksi jääneen alueen fosforyloimiseksi ja ligatoitumattomat kytkijäjakso poistettiin suorittamalla cDNA:lle käsittely Sepharose CL4B -pylväessä. Kytkijä-adapterijaksoilla varustettu cDNA ligatoitiin EcoRI:lla pilkottuihin ja defosforyloituihin bakteriofagi *λ*gt10:n käsivarsiin (Huynh, et al., *cDNA Cloning: A Practical Approach*, Glover, ed., IRL Press, pp 49 - 78), joiden molaarinen konsentraatio oli samansuuruinen. Ligatoitu DNA pakattiin faagipartikkeleihin käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa rea-

genssipakkausta rekombinanttikirjaston aikaansaamiseksi (Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA, USA). Rekombinanttien lukumäärää lisättiin edelleen maljaamalla faagi *E. coli* -kannan c600(hfl⁻) bakteerikasvuston pinnalle.

5 Faagi-DNA puhdistettiin tulokseksi saadusta λ gt10:n cDNA-kirjastosta ja cDNA-liitosjaksot irrotettiin pilkkomalla restriktioentsyymillä NotI. Pilkotulle seokselle agarosigeelissä tehdyn elektroforeesin jälkeen eristettiin yli 2 000 ep:n suuruiset cDNA-molekyylit.

10 Tulokseksi saadut cDNA-molekyylit ligatoitiin eukaryoottiseen ilmentämisvektoriin pCAV/NOT, joka oli suunniteltu nisäkässoluihin transfektoituna ilmentämään monipaikkaiseen kloonauskohtaansa liitettyjä cDNA-jaksoja. pCAV/NOT oli koottu pDC201:n [pMLSV:n johdannainen, joka on kuvattu
15 aiemmin julkaisussa Cosman, et al., Nature 312 (1984) 768], SV40:n ja sytomegaloviruksen DNA:sta ja se sisältää transkription suunnassa replikaation alkukohdasta lueteltuna peräkkäiset jaksot, jotka ovat: (1) SV40-jaksot, jotka ovat peräisin koordinaateista 5 171 - 270 ja joihin kuuluvat replikaation alkukohta, enhancer-jaksot ja varhainen ja myöhäinen promoottori; (2) sytomegaloviruksen jaksot, joihin kuuluvat promoottori- ja enhancer-alueet (nukleotidit 671 -
20 +63 jaksosta, joka on julkaistu julkaisussa Boechart, et al. [Cell 41 (1985) 521]; (3) adenovirus-2:n jaksot, jotka sisältävät ensimmäisen eksonin ja osan intronia, joka sijaitsee kolmiosaisen johtojakson ensimmäisen ja toisen eksonin välissä, toisen eksonin ja osan kolmiosaisen johtojakson kolmatta eksonia sekä monipaikkaisen kloonauskohdan (MCS), joka sisältää kohdat XhoI:lle, KpnI:lle, SmaI:lle, NotI:lle ja BglI:lle; (4) SV40:n jaksot, jotka ovat peräisin koordinaateista 4 127 - 4 100 ja 2 770 - 2 533 ja joihin sisältyy varhaisen transkription polyadenylaatio- ja terminaatio-signaalit; (5) jaksot, jotka ovat peräisin
30 pBR322:sta ja pDC201:n virukseen liittyvistä VAI- ja VAII-jaksoista, yhdessä adenoviruksen jaksojen 10 532 - 11 156 kanssa, jotka sisältävät VAI- ja VAII-geenit, joiden jäl-

keen tulevat alueilta 4 363 - 2 486 ja 1 094 - 375 olevat pBR322:n jaksot, jotka sisältävät ampisilliiniresistenssigeenin ja replikaation alkukohdan. pCAV/NOT on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection hakunumerolla ATCC 68 014.

5 Tulokseksi saatua pCAV/NOT:ssa olevaa WI-26 VA4-cDNA-kirjastoa käytettiin *E. coli* kannan DH5 α transformoimiseen ja rekombinantit maljattiin, jotta saataisiin aikaan noin 800 pesäkettä maljaa kohti ja riittävä määrä maljoja
10 yhteensä noin 50 000 pesäkkeen aikaansaamiseksi seulontaa kohti. Pesäkkeet kaavittiin kultakin maljalta, yhdistettiin ja kustakin yhdistetystä preparaattista valmistettiin plasmidi-DNA. Tämän jälkeen yhdistettyä DNA:ta käytettiin transfektoimaan lähes konfluentti kerros apinan COS-7-solu-
15 ja käyttäen DEAE-dekstraania, jonka jälkeen suoritettiin käsittely klorokiinilla julkaisuissa Luthman, et al. [Nucl. Acids Res. 11 (1983) 1295] ja McCutchan, et al. [J. Natl. Cancer Inst. 41 (1986) 351] kuvatulla tavalla. Tämän jäl-
20 keen soluja kasvatettiin viljelmässä kolme päivää, minkä tarkoituksena oli saada liitetyt jaksot ilmentymään väliaikaisesti. Kolmen päivän kuluttua soluviljelmien supernatantit heitettiin pois ja kullakin maljalla olevista yksisolukerroksista määritettiin niiden kyky sitoa TNF:ää mene-
25 tellen tässä seuraavalla tavalla. Kuhunkin maljaan lisät-
tiin kolme millilitraa sitoutumismediumia, joka sisälsi ¹²⁵I-leimalla varustettua Flag®-TNF:ää, jonka konsentraatio oli $1,2 \times 10^{-11}$ M, ja maljoja inkuboitiin 4 °C:ssa 120 mi-
30 nuuttia. Tämän jälkeen tämä medium heitettiin pois ja kukin maljoista pestiin kerran kylmällä sitoutumismediumilla (tämä ei sisältynyt lainkaan leimalla varustettua TNF:ää) ja kaksi kertaa kylmällä PBS:lla. Tämän jälkeen kunkin mal-
35 jan reunat poistettiin murtamalla, josta jäi jäljelle laakea levy, joka saatettiin kosketukseen röntgenfilmin kanssa 72 tunnin ajaksi 70 °C:ssa käyttäen vahvistusverkkoa julkaisussa Sims, et al., Science 241 (1988) 585, kuvatulla tavalla. TNF:ää sitova aktiivisuus saatiin näkyville valo-

tetuilla filmeillä tummana kohteena suhteellisen yhtenäistä taustaa vasten.

Kun kirjastosta oli seulottu tällä tavalla noin 240 000 rekombinanttia, havaittiin, että yhdestä transfek-

5 tanttiyhdistelmästä saatiin TNF:ää sitovia kohteita, jotka olivat selvästi näkyvissä taustan valottumista vasten. Tämän jälkeen käytettiin positiivisesta yhdistelmästä pe-

10 räisin olevaa pakastettua bakteerikantapreparaattia sel- laisten maljojen valmistamiseksi, jotka sisälsivät noin 150 pesäkettä. Näistä maljoista tehtiin kopiokappaleet nitro-

15 selluloosasuodattimille, jonka jälkeen maljoilta kaavittiin materiaalia, valmistettiin plasmidi-DNA ja tämä transfek-

toitiin edellä kuvatulla tavalla positiivisen maljan tun-

20 nistamiseksi. Tämän maljan nitroselluloosakopiosta peräisin olevista yksittäisistä pesäkkeistä saatuja bakteereja kas-

vatettiin 0,2 ml:n suuruisissa viljelmissä, joita käytet-

tiin sitten sellaisen plasmidi-DNA:n valmistamiseen, joka transfektoitiin COS-7-soluihin edellä kuvatulla tavalla. Tällä tavoin eristettiin yksi klooni, joka kykeni aikaan-

25 saamaan humaani-TNF-R:n ilmentymisen COS-soluissa. Tätä TNF-R-cDNA:ta sisältävä ilmentämisvektori pCAV/NOT on tal-

letettu talletuslaitokseen American Type Culture Collec-

tion, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA (haku-

numero 68 088) ja sille on annettu nimitys pCAV/NOT-TNF-R.

25

Esimerkki 4

Liukoista huTNF-RA235:tä koodaavien cDNA-molekyylin konstruktio

30

Konstruoitiin cDNA, joka koodaa liukoista huTNF-RA235:ttä. Tämän molekyylin koodaama proteiini sisältää kuvion 2A mukaisen aminohappojakson -22 - 235. Signaalijak-

35 son muokkauksesta syntyy proteiini, jolla on kuvion 2A mu- kainen aminohappojakso 1 - 235. pCAV/NOT-TNF-R:stä pilkot-

tiin restriktioentsyymeillä Not1 ja Pvu2 840 ep:n suuruinen fragmentti. Not1:n katkaisukohta on pCAV/NOT-TNF-R:n moni-

paikkaisen kloonauskohdan kohdalla ja Pvu2:n katkaisukohta on TNF-R:ää koodaavalla alueella 20 nukleotidin verran

transmembraanialueesta 5'-puoleiseen suuntaan. TNF-R-jaksojen 3'-puoleisen pään uudelleenkonstruoimiseksi syntetioitiin kaksi oligonukleotidia ja ne liitettiin pituussuunnassa yhteen oligonukleotidikytkijäjaksos muodostamiseksi, joka on:

5

jaksotunniste nro 9

Pvu2 BamH1 Bgl2

CTGAAGGGAGCACTGGCGACTAAGGATCCA

10

GACTTCCCTCGTGACCGCTGATTCCTAGGTCTAG

AlaGluGlySerThrGlyAspEnd

Tässä oligonukleotidikytkijäjaksossa on terminaaliset Pvu2- ja Bgl2-restriktiokohdat, se muodostaa uudelleen TNF-R:n kaksikymmentä nukleotidia, minkä jälkeen tulee terminaatiokodoni (alleviivattuna) ja BamH1-restriktiokohta (tämä on käyttökelpoinen eristettäessä kokonainen liukoinen TNF-R pilkkomalla Not1:n ja BamH1:n seoksella). Tämä oligonukleotidi ligatoitiin sitten 840 ep:n suuruisen Not1/Pvu2-TNF-R-liitosjakson kanssa Bgl2:n ja Not1:n seoksella pilkottuun pCAV/NOT:hen plasmidin psolhuTNF-RA235/CAVNOT aikaansaamiseksi, joka transfektoitiin COS-7-soluihin edellä kuvatulla tavalla. Tämä ilmentämisvektori indusoi sellaisen liukoisen humaani-TNF-R:n ilmentymisen, joka kykeni sitomaan TNF:ää.

25

Esimerkki 5

Liukoista huTNF-RA185:tä koodaavien cDNA-molekyylien konstruktio

Konstruoitiin sellaista liukoista huTNF-RA185:ttä koodaava cDNA, jolla on kuvion 2A mukaisten kohtien -22 - 185 välinen aminohappojakso (tai aminohapot 1 - 185 signaalijakson muokkautumisen jälkeen asiaankuuluvassa isäntäsolussa), pilkkomalla pCAV/NOT-TNF-R:sta 640 ep:n suuruisen fragmentti restriktioentsyymeillä Not1 ja Bgl2. NotI:n katkaisukohta on pCAV/NOT-TNF-R:n monipaikkaisen kloonauskohdan kohdalla ja Bgl2:n katkaisukohta on TNF-R:ää koodaavalla alueella nukleotidin 637 kohdalla, joka sijaitsee

30

35

Tämä edellä oleva oligonukleotidikytkijäjako konstruoi uudelleen reseptorimolekyylin 3'-puoleisen pään nukleotidiin 579 asti (aminohappo 142), jota seuraa terminaatiokodoni (alleviivattu). Tämä oligonukleotidi ligatoitiin siten 550 ep:n suuruisen Not1/AlwN1-TNF-R-liitosjakson kanssa Not1/Bgl2:lla pilkottuun pCAV/NOT:hen, minkä tuloksena saatiin ilmentämisvektori psolTNFRΔ142/CAVNOT, joka transfektoitiin COS-7-soluihin edellä kuvatulla tavalla. Tämä ilmentämisvektori ei indusoinut sellaisen liukoisen humaanin TNF-R:n ilmentymistä, joka olisi kyennyt sitomaan TNF:ää. Arvellaan, että tämä tietty nimenomainen konstruktio ei kyennyt ilmentämään biologisesti aktiivista TNF-R:ää, koska yksi tai useampi välttämättömistä kysteiniiniryhmistä (esimerkiksi Cys¹⁵⁷ tai Cys¹⁶³), jotka tarvitaan molekyylin sisäiseen sitoutumiseen (TNF-R-molekyylin asiaankuuluvan tertiäärin rakenteen muodostamiseksi) oli eliminoitunut.

Esimerkki 8

Tyypin I humaanin IL-1R:n cDNA-kloonien eristys

cDNA, joka koodaa tyypin I humaanin IL-1R-proteiinia, eristettiin hybridisoimalla koettimeen, joka oli peräisin tyypin I muriini-IL-1R:n cDNA:sta. Tämän muriini-IL-1R:n cDNA:n kloonauksen kuvaus on kuvattu julkaisun EP-318 296 esimerkissä 4. Muriini-cDNA:n sisältävä vektori on talletettu 19.11.1987 talletuslaitokseen American Type Culture Collection nimityksellä GEMBL78 ja sille on annettu hakunumero ATCC 67 563.

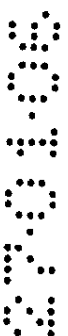
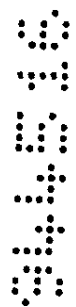
Tämän talletetun muriinikloonin 78 2 356 emäsparin (ep) suuruinen fragmentti eristettiin julkaisussa Sims, et al. [Science 241 (1988) 585] kuvatulla tavalla ja se varustettiin radioaktiivisella leimalla käytettäväksi koettimena käyttäen DNA-polymeraasi-I:llä suoritettua katkostranslaatiota. Käytetty menetelmä oli olennaisesti samanlainen kuin julkaisussa Maniatis, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) p. 109) kuvattu menetelmä.

Tätä koetinta käytettiin seulontaan, jossa humaani-IL-1R:ää haettiin humaani-cDNA-kirjastoista julkaisussa Sims, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86 (1989) 8946, kuvatulla tavalla. Konstruoitiin cDNA-kirjasto käyttämällä sellaisen polyadenyloidun mRNA:n käänteistranskriptiota, joka oli eristetty kokonais-RNA:sta, joka oli uutettu sellaisen humaani-T-solulinjan viljellyistä soluista, jolle oli annettu nimitys klooni 22 ja joka on kuvattu julkaisussa Acres, et al. [J. Immunol. 138 (1987) 2132]. Näitä soluja viljeltiin julkaisussa Acres, et al. (edellä) kuvatulla tavalla RPMI 1640 -mediumissa, joka sisälsi 10-%:ista fetaalista naudan seerumia ja jossa oli OKT3-vasta-ainetta konsentraatiossa 10 ng/ml sekä humaani-IL-2:ta konsentraatiossa 10 ng/ml. cDNA tehtiin kaksinauhaiseksi käyttäen DNA-polymeraasi I:tä, sen päät tasoitettiin käyttäen T4:n DNA-polymeraasia, metyloitiin EcoRI-metylaasilla cDNA:ssa olevien EcoRI:n katkaisukohtien suojaamiseksi ja ligatoitiin EcoRI-kytkijäjaksoihin. Tulokseksi saadut konstruktiot pilkottiin EcoRI:lla kaikkien kytkijäjakson kopioiden poistamiseksi cDNA:n kummastakin päästä yhtä jaksoa lukunottamatta ja ligatoitiin λ gt10:n EcoRI:lla pilkottuihin ja defosforyloituihin käsivarsiin (Huynh, et al., DNA Cloning: A Practical Approach, Glover, ed., IRL Press, pp. 49 - 78). Ligatoitu DNA pakattiin faagipartikkeleihin käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa reagenssipakkausta (Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA, USA 92121) rekombinanttikirjaston aikaansaamiseksi. Rekombinantit maljattiin E. coli -kannalle C600 (hfl-) ja seulottiin tavanomaisilla plakkihybridisaatiomenetelmillä kohtalaisen rajoittavissa olosuhteissa (50 °C, 6 x SSC).

Useiden seulontakierrosten jälkeen kirjastosta eristettiin yhdeksän kloonia, jotka hybridisoituivat cDNA-koettiin. Nämä kloonit puhdistettiin plakkipuhdistuksella ja niitä käytettiin bakteriofagi-DNA:n valmistamiseen, joka pilkottiin EcoRI:lla. Pilkkomisseoksille suoritettiin elektroforeesi agarosigeelissä, blottaus nylonsuodattimille ja

niiden hybridisoituminen tutkittiin uudelleen. Kloonit pilkottiin EcoRI:lla, jonka jälkeen suoritettiin preparatiivinen agarosigeelielektroforeesi ja jatkokloonaukseen EcoRI:llä pilkottuun vakiokloonauksvektorin pBR322:n johdannaiseen (pGEMBL), joka sisälsi polylinker-jakson, jossa oli ainutkertaisena esiintyvä EcoRI-kohta, BamHI-kohta ja useita muita ainutkertaisena esiintyviä restriktiokohtia. Kuvaava esimerkki tämän tyyppisistä vektoreista on esitetty julkaisussa Dente, et al. [Nucl. Acids Res. 11 (1983) 1645].

4,8 ke:n suuruisen humaani-IL-1R-kloonin restriktiokartoitus ja sekvenssointi antoi viitteitä siitä, että tämä kloni sisälsi 518 aminohappoa koodaavan jakson, jonka aminohappojakso vastaavaan muriinijaksoon verrattuna oli transmembraanialueesta molekyylin pään suuntaan olevalla solunulkoisella eli N-terminaalialueella 80-%:isesti identtinen, transmembraanialueella 63-%:isesti identtinen ja sytoplasmissella eli C-terminaalialueella 80-%:isesti identtinen. Humaani-IL-1R-kloonin 5'-puoleisesta osasta peräisin oleva 440 ep:n suuruinen EcoRI-NsiI-fragmentti varustettiin katkostranslaatiota käyttäen ³²P-lemmalla edellä kuvatulla tavalla ja tätä käytettiin sellaisen cDNA-kirjaston seulontaan, joka oli tehty satunnaisalukkeiden avulla edellä kuvatulla tavalla valmistetusta humaani-T-solulinjan kloonin 22 mRNA:sta. Eristettiin 23 koettiin hybridisoituvaa kloonin ja ne analysoitiin restriktiokartoituksella. Yhdelle näistä klooneista tehdystä sekvenssoinnista saatiin jaksoa koskevaa informaatiota, joka vastasi humaaniproteiinin 34 viimeistä N-terminaalista aminohappoa. Tämän tyyppin I humaani-IL-1R:n täydellisen koodaavan alueen DNA-jakso ja siitä päätelty aminohappojakso on esitetty jaksotunnisteissa nro 5 ja 6. Tämä humaani-IL-1R-proteiini käsittää 569 aminohappoa (20 aminohapon sisältäen signaalipeptidi mukaan luettuna), ja se sisältää 16 kysteiiniryhmää, joista 13 on säilynyt hiiren ja ihmisen geenien välillä. Humaanijaksossa on lisäksi 6 potentiaa-



lista N-glykosylaatiokohtaa, joista 5 on säilynyt hiiren ja ihmisen välillä.

Esimerkki 9

Tyypin II IL-1R:ää koodaavien cDNA-molekyylien eristys

5 Tyypin II humaani-IL-1R:ää koodaava DNA-jakso eristettiin cDNA-kirjastosta, joka oli valmistettu vakio menetelmien avulla sellaisen polyadenyloidun RNA:n käänteis-
10 transkription avulla, joka oli eristetty lymfoblastoidisesta humaani-B-solujen solulinjasta CB23, joka on kuvattu julkaisussa Benjamin & Dover, Blood 75 (1990) 2017. Pää-
piirteittäin voidaan todeta, että CB23-solulinja on EBV:llä transformoitu napaveren (CB) lymfosyyttisolulinja, joka oli valmistettu käyttäen julkaisussa Benjamin, et al., Proc.
15 Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 3547, kuvattuja menetelmiä.

CB23-kirjasto seulottiin käyttämällä yhdistettyjen cDNA-fragmenttien modifioitua suoraa ilmentämistä apinan munuaissolulinjassa CV1/EBNA-1 sellaisen nisäkäsilmentämisvektorin (pCD406) avulla, joka sisältää SV40:stä, Epstein-Barrin viruksesta ja pBR322:sta peräisin olevat replikaation alkukohdat. pDC406 on julkaisussa Dover, et al., J. Immunol. 142 (1989) 4314 kuvatun HAV-EO:n johdannainen. pCD406 eroaa HAV-EO:sta siinä suhteessa, että siitä on deletoitu HAV-EO:ssa olevassa adenovirus 2:n kolmiosaisessa johtojaksossa oleva introni. CV-1/EBNA-1-solulinja oli valmistettu transfektoimalla CV-1-solulinja Epstein-Barrin viruksen tuma-antigeeni-1:tä (EBNA-1:tä) koodaavalla geenillä sekä CMV:n säätelyjaksoja sisältävällä vektorilla sillä tavoin, että EBNA-1 ilmentyy humaani-CMV:n esivarhaisen enhancer-jakson ja promoottorijakson yhdistelmän ohjaamana. EBNA-1-geenin avulla EBV:n replikaation alkukohdan sisältävien ilmentämisvektoreiden, kuten pDC406:n, on mahdollista replikoitua episomina.

30 Transfektantit, jotka ilmentävät biologisesti aktiivista tyypin II IL-1R:ää, tunnistettiin aluksi käyttäen modifioitua objektilaseilla tehtävää autoradiografista me-
35

netelmää olennaisesti julkaisussa Gearing, et al., EMBO J. 8 (1989) 3667 kuvatulla tavalla. Tämä tapahtui pääpiirteittäin siten, että CV-1/EBNA-1-solut transfektoitiin suoraan objektilaseilla pDC406:ssa olevilla DNA-minipreparaateilla, joka olivat peräisin yhdistetyistä cDNA-klooneista, ja soluja viljeltiin 2 - 3 päivää sillä tavoin, että niiden oli mahdollista ilmentää väliaikaisesti tyyppin I IL-1R:ää. Tämän jälkeen transfektoituja soluja sisältäviä objektilaseja inkuboitiin ¹²⁵I-IL-1β:ää sisältävässä mediumissa, pestiin sitoutumattoman leimalla varustetun IL-1β:n poistamiseksi, kiinnitettiin gluteerialdehydillä, kastettiin neste-mäiseen valokuvaus-emuksioon ja valotettiin pimeässä. Kun objektilasit oli kehitetty, ne tutkittiin yksittäin mikroskoopilla ja tyyppin II IL-1R:ää ilmentävät positiiviset solut tunnistettiin autoradiografisten hopeajyvien esiintymisen perusteella vaaleata taustaa vastaan.

Tätä lähestymistapaa käyttäen seulottiin noin 250 000 cDNA-molekyyliä noin 3 000 cDNA-molekyylin yhdistelminä käyttäen autoradiografista objektilasimenetelmää, kunnes yhden transfektanttiyhdistelmän määrittäminen osoitti siinä esiintyvän useita IL-1β:n sitoutumisen suhteen selvästi positiivisia soluja. Tämä yhdistelmä jaettiin sitten 500 molekyylin yhdistelmiin ja seulottiin uudelleen objektilasiantoradiografiolla. Tunnistettiin positiivinen yhdistelmä. Tämä yhdistelmä jaettiin edelleen 75 molekyylin yhdistelmiin ja seulottiin maljoilla tehdyillä sitoutumismäärityksillä, jotka analysoitiin kvantitoimalla sitoutuneen ¹²⁵I-IL-1β:n määrä. Solut kaavittiin maljoilta ja laskettiin sen määrittämiseksi, mikä 75 ehdokasta sisältävä yhdistelmä oli positiivinen. Tästä 75 ehdokkaan yhdistelmästä seulottiin yksittäisiä pesäkkeitä, kunnes tunnistettiin yksi kloonin, joka ohjasi sellaisen pintaproteiinin synteesiä, jolla oli havaittavaa IL-1β:ää sitovaa aktiivisuutta. Tämä kloonin eristettiin ja sen liitosjakso sekvenssoitiin sen tyyppin II humaani-IL-1R cDNA:n jakson määrittämiseksi, joka on esitetty tämän koodaaman aminohappojakson

ohella jaksotunnisteissa nro 7 ja 8. Tyypin II humaani-IL-1R cDNA:ta sisältävä pDC406-kloonausvektori, jolle on annettu nimitys pHu IL-1R-II 75, talletettiin 5.7.1990 E. coli -isäntäsoluissa talletuslaitokseen American Type Culture Collection, Rockville, MD. USA (ATCC) hakunumerolla ATCC 68 337. Talletus tehtiin Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti.

Kuten on asianlaita useimpien nisäkkäiden geenien suhteen, on nisäkkäiden tyypin II IL-1R otaksuttavasti monieksonisten geenien koodaama. Tämän keksinnön suojapiiriin katsotaan kuuluvan sellaiset vaihtoehtoiset mRNA-konstruktiot, jotka ovat tulosta erilaisista mRNA:n transkription jälkeisistä silmukoitumistapahtumista ja joissa esiintyy suuria identtisiä tai samanlaisia jaksoja sisältäviä alueita niihin cDNA-molekyyleihin verrattuna, joita tässä keksinnössä esitetyt patenttivaatimukset koskevat.

Esimerkki 10

Liukoista tyypin II humaani-IL-1R:ää koodaavien cDNA-molekyylien konstruktio ja ilmentäminen

cDNA, joka koodaa liukoista tyypin II humaani-IL-1R:ää (jonka aminohappojakso on jaksotunnisteen nro 8 aminohappojakson -13 - 333 mukainen), konstruointiin polymeeraasiketjureaktio (PCR) -menetelmällä käyttäen templaattina täysimittaista tyypin II IL-1R:n cDNA-kloonina 75 (ATCC 68 337) vektorissa pDC406 (tämä on kuvattu esimerkissä 9). Konstruointiin ensin 5'-puoleinen oligonukleotidialuke (jaksotunniste nro 14) ja 3'-puoleinen oligonukleotidialuke (jaksotunniste nro 15), jotka olivat: jaksotunniste nro 14:

5'-GCGTCGACCTAGTGACGCTCATACAAATC-3'

<SalI>

jaksotunniste nro 15:

5'-GCGCGGCCGCTCAGGAGGAGGCTTCCTTGACTG-3'

<-NotI->End\1991

\1172

35

5'-puoleinen alue vastaa tyyppin II humaani-IL-1R-kloonin 75 (jaksotunniste nro 7) translaation osallistumattomalta alueelta peräisin olevia nukleotideja 31 - 51, joissa on 5'-puolelle lisätty SalI-restriktiokohdasta koostuva lisäosa; tämä nukleotidijakso kykenee liittymään pitkittäin yhteen siihen (-)-nauhaan, joka on komplementaarinen humaani-kloonin 75 nukleotidien 31 - 51 suhteen. 3'-puoleinen alue on komplementaarinen nukleotidien 1 191 - 1 172 suhteen (tämä sisältää antisense-nukleotidit, jotka koodaavat tyyppin II humaani-IL-1R kloonin 75 kolmea aminohappoa ja sen 5'-puoleiseen päähän on liitetty NotI-restriktiokohdasta ja lopetuskodonista koostuva lisäosa.

1,5 ml:n vetoiseen Eppendorf-mikrosentrifugiputkeen lisättiin PCR-reagenssit, jotka olivat: 10 x PCR-puskuria (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 25 °C, 15 mM MgCl₂ ja 1 milligramma gelatiinia millilitrassa) (Perkins-Elmer Cetus, Norwalk, CN), 10 µl kutakin dNTP:tä sisältävää 2-millimolaarista liuosta (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP ja 2 mM dTTP), 2,5 yksikköä Taq-DNA-polymeraasia (0,5 µl vakioliuosta, jonka konsentraatio oli 5 000 yksikköä/ml) (Perkins-Elmer Cetus), 50 ng templaatti-DNA:ta ja 5 µl kunkin edellä olevan oligonukleotidialukkeen liuosta, joiden konsentraatio oli 20 µM, ja 74,5 µl vettä, jolla lopullinen tilavuus säädettiin 100 µl:ksi. Valmiin liuoksen päälle lisättiin 100 µl parafiiniöljyä. PCR suoritettiin käyttäen DNA-lämmityssykli-inkubointilaitetta (thermal cycler) (Ericomp, San Diego, CA) denaturoimalla templaatti aluksi 94 °C:ssa 90 sekunnin ajan, antamalla molekyylien liittyä pituussuunnassa uudelleen yhteen 55 °C:ssa 75 sekunnin ajaksi ja pidentämällä cDNA 72 °C:ssa 150 sekunnin ajan. Tämän jälkeen PCR:n suoritukseen käytettiin 20 monistus-sykliä käyttäen ohjelmallisesti säädettyjä vaiheita (denaturaatio 94 °C:ssa, 25 s; yhteenliittäminen 55 °C:ssa, 45 s; pidentäminen 72 °C:ssa, 150 s), jonka jälkeen käytettiin viisi minuuttia kestävä pidentämistä 72 °C:ssa.

Näyte poistettiin parafiiniöljystä ja DNA uutettiin käyttämällä uuttoa fenolin ja kloroformin seoksella ja sentrifugoimalla tehtyä pylväskromatografiaa G-50:ssa (Boehringer Mannheim). 10 µl:n suuruiset erät uutettua DNA:ta erotettiin elektroforeesilla 1-%:isessa SeaKem-agarosissa (FMC-Bioproducts, Rockland, ME) ja värjättiin etidiumbromidilla sen varmistamiseksi, että DNA-fragmentin koko oli yhdenmukainen ennustetun tuotteen suhteen.

Tämän jälkeen pilkottiin 20 µl:n erä PCR:lla monistettuja cDNA-tuotteita SalI- ja NotI-restriktioentsyymeillä vakiomenetelmiä käyttäen. SalI-/NotI-restriktiofragmentti erotettiin sitten 1,2-%:isessa matalassa lämpötilassa hyytyvässä (LGT) SeaplaqueTM-agarosissa ja fragmenttia edustava vyöhyke eristettiin. Tämä fragmentti ligatoitiin pDC406-vektoriin tavallisella "geelin sisässä tehtävällä" ligaatiomenetelmällä. Tulokseksi saatu vektori transfektoitiin CV1-EBNA-soluihin ja suoritettiin liukoisen IL-1R-proteiinin ilmentäminen.

Esimerkki 11

Di-TNF-R:ää koodaavan vektorin konstruointi

Vektori, joka koodaa kaavan TNF-R-peptidikytkijä-jakso-TNF-R mukaista fuusioproteiinia ja joka on esitetty kuviossa 3, konstruointi seuraavasti. TNF-R-jaksossa olevat asiaankuuluvat restriktioentsyymien katkaisukohtat on myös esitetty kuvioissa 2A - 2B.

Ilmentämisvektori, joka oli konstruoitu esimerkissä 4 ja jolle oli annettu nimitys psol huTNF-RA235/CAVNOT, pilkottiin Not I -restriktioentsyymillä, jonka katkaisukohta on pCAV/NOT-vektorin monipaikkaisen kloonauskohdan kohdalla (toisin sanoen tähän liitettyyn TNF-R-jaksoon nähden vastasuunnassa olevassa kohdassa). Not I:llä suoritetusta pilkkomisesta syntynyt vapaaksi jäänyt nauhan osa täytettiin käyttäen DNA polymeraasi I:n Klenow-fragmenttia tasaisen pään aikaansaamiseksi. Tämän jälkeen vektori pilkottiin Bam HI:lla, jonka katkaisukohta sijaitsee myötäsuntaan

aminohappoa 235 vastaavan kodonin jälkeen sijaitsevasta lopetuskodonista, esimerkissä 4 kuvatulla tavalla.

NotI/Bam HI -fragmentti, jonka päät oli tehty tassaiseksi ja joka sisälsi TNF-R-jakson, eristettiin tavanomaisten menetelmien mukaisesti ja liitettiin plasmidivektoriin, josta käytettiin nimitystä pCAV/DHFR ja joka oli pilkottu Sma I:llä ja Bgl II:lla. pCAV/DHFR-vektori on ilmentämisvektori, joka sisältää monipaikkaiseen kloonaukseen nähden vastasuunnassa sijaitsevat SV40:n promoottorijaksot sekä muita esimerkissä 3 kuvattuja pCAV/NOT:n piirteitä ja jossa selektiomarkkerina on myös dihydrofolaatireduktaasi (DHFR) -geeni. Niille nisäkässoluille, jotka ovat saaneet sisäänsä vektorin mutta jotka ovat muutoin DHFR⁻-tyyppisiä, on DHFR-geenistä hyötyä selektiossa, jossa soluja kasvatetaan metotreksaatin (MTX) läsnä ollessa. Pilkkomisesta Sma I:llä saadaan syntymään tasaiset päät, joihin TNF-R:n sisältävän fragmentin Not I:llä tasaisesti tehdyt päät ligatoidaan. Bgl II:lla syntyneet vapaaksi jääneet nauhan päät ligatoidaan TNF-R:ää sisältävän fragmentin päihin, jotka on saatu pilkkomalla Bam HI:llä. Ligaatio hävittää Bam HI- ja Bgl II -kohdat. E. coli -solut transformoidaan ligaatioseoksella tavanomaisten menetelmien avulla. Plasmidi-DNA otetaan talteen isäntäsoluista ja haluttu konstruktio varmistetaan oikeaksi restriktioanalyysillä. Tulokseksi saadulle vektorille, joka sisältää TNF-R-liitosjakson, on annettu nimitys pCAV/DHFR/TNF-R.

Eristettiin DNA-fragmentit, jotka on tarkoitettu käytettäväksi kahta sellaista TNF-R-polypeptidiä koodaavan vektorin valmistamiseksi, joissa nämä ovat peptidikytkijäjakson erottamina, ja nämä olivat:

(A) pCAV/DHFR/TNF-R-vektorin Asp718 (restriktioentsyymi) - Esp I -fragmentti. Asp718 pilkkoo vektorin siihen liitettyyn TNF-R-jaksoon nähden vastasuunnassa olevasta kohdasta; Esp I (tämä on saatavilla U.S. Biochemicals -yhtiöstä), pilkkoo TNF-R-jakson kuviossa 2A esitetystä kohdasta. Halutun fragmentin pituus on noin 6,7 kiloemäsparia

(kep) ja se sisältää vektorin jaksot ja TNF-R-jakson 3'-puoleisen pään.

(B) Esimerkissä 4 konstruoidun ja plasmidiksi psolhu TNF-R Δ235/CAVNOT nimitetyn ilmentämisvektorin Asp718 - PvuII -fragmentti. Asp718 pilkkoo vektorin siihen liitettyyn TNF-R-jaksoon nähden vastasuunnassa olevasta kohdasta. Haluttu 865 ep:n suuruinen fragmentti sisältää TNF-R-jakson, joka ulottuu 5'-puoleisesta signaalijaksosta esimerkiksi 4 esitettyyn Pvu II -kohtaan.

(C) Kaksinauhainen oligonukleotidi, jolla on jakso (jaksotunnisteet nro 16 ja 17):

5' CTGAAGGGAGCACTGGCGACGGTGGCGGTGGATCCGGCGGTGGCGGGCGGCTCATTGCCCGCCCAGG 3'
 3' GACTTCCCTCGTGACCCTGCCACCGCCACCTAGGCCGCCACCGCCCGGAGTAACGGGGCGGGTCC 3'
 15 GluGlySerThrGlyAspGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlyGlySerLeuProAlaGlnVal

(D) Esimerkissä 4 konstruoidun ja plasmidiksi psolhu TNF-R Δ235/CAVNOT nimitetyn ilmentämisvektorin Bgl I - EspI -fragmentti. Halutun fragmentin pituus on noin 304 ep. Bgl I pilkkoo TNF-R:n aminohappoa 5 (Val) vastaavan kodonin sisällä olevasta kohdasta; Esp I pilkkoo TNF-R:n jakson kuviossa 2A esitetystä kohdasta; fragmentti (A) muodostaa loppuosan (3'-puoleisen pään) tästä liukoista TNF-R:ää koodaavasta jaksosta.

Oligonukleotidi (C) valmistetaan oligonukleotidien kemialliseen synteesiin käytettävillä tavanomaisilla menetelmillä. Tämä oligonukleotidi konstruoi uudelleen ensimmäisen TNF-R:n jakson 3'-puoleisen pään Pvu II -kohdasta solunulkoisen domeenin viimeiseen aminohappoon (asemassa 235 oleva Asp). Tämä oligonukleotidi sisältää myös lukukehyksessä olevan jakson, joka koodaa peptidikytkijäjaksoa Gly₄SerGly₅Ser. Oligonukleotidin tämän osan jaksoa voidaan haluttaessa muuttaa muita peptidikytkijäjaksoja koodaavaksi. Oligonukleotidi C konstruoi myös uudelleen toisen TNF-R:n jakson 5'-puoleisen pään leusiinia vastaavasta kodonista, joka on kypsän proteiinin ensimmäinen aminohappo,

nauhan 3'-puoleisessa yli jääneessä osassa olevaan valiinia (aminohappoa 5) vastaavaan osittaiseen kodoniin, millä Val-kodoni muodostuu uudelleen ligatoitaessa tämä nauha siihen komplementaariseen vapaaksi jääneeseen nauhan osaan, joka sijaitsee fragmentin D Bgl I:lla pilkotussa päässä.

Kirjaimilla A - D merkityt DNA-fragmentit ligatoitiin toisiinsa kuviossa 3 esitetyistä asemista sellaisen vektorin muodostamiseksi, jolle annettiin nimitys pCAV DHFR Di-TNF-R ja joka koodaa tämän keksinnön mukaista fuusio-
 10 proteiinia. E. coli -soluja transformoidaan ligaatioseoksella tavanomaisten menetelmien avulla. Plasmidi-DNA otetaan talteen isäntäsoluista ja haluttu konstruktio varmistetaan restriktioanalyysillä. Tämän ilmentämisvektorin koodaama vastasuunnassa oleva TNF-R-polypeptidi sisältää jak-
 15 sotunnisteen nro 2 mukaiset aminohapot -22 - 235 (toisin sanoen liukoisen TNF-R:n, joka sisältää N-terminaalisen jakson ja kokonaisen solunulkoisen domeenin mutta joka ei sisällä lopetuskodonia). Myötäsuunnassa olevasta TNF-R-polypeptidistä puuttuu signaalijakso ja se sisältää jakso-
 20 tunnisteen nro 2 mukaiset aminohapot 1 - 235 ja välittömästi aminohapon 235 jälkeen sijoitetun lopetuskodonin. Tämän nimenomaisen konstruktion peptidikytkijäjakso on Gly₄SerGly₅Ser.

Tällä ilmentämisvektorilla transfektoidaan nisäkäs-
 25 soluja tavanomaisia menetelmiä käyttäen ja niitä viljellään halutun fuusioproteiinin tuottamiseksi. Yksi sopiva nisäkässolulinja on DHFR⁻-tyyppinen kiinanhamsterin munasarja-
 solulinja, jolle on annettu nimitys CHO-K1 ja joka on saatavilla talletuslaitoksesta American Type Culture Col-
 30 lection, Rockville, MD, hakunumerolla CCL61. Solut voidaan transfektoida ilmentämisvektorilla tavanomaisella kalsiumfosfaattisaostuksella olennaisesti julkaisussa Graham ja van der Eb, Virology 52 (1983) 456, kuvatulla tavalla. Transfektoituja soluja viljellään tarkoitukseen sopivissa
 35 tavanomaisissa olosuhteissa ja halutun fuusioproteiinin

esiintyminen soluviljelymediumissa varmistetaan määrityksillä, kuten esimerkeissä 1 ja 2 kuvatuilla määrityksillä.

Toinen sopiva nisäkässolulinja on COS-7-solulinja. Yhdessä kokeessa COS-7-solut transfektoitiin edellä kuvatuilla TNF-R-dimeeriä koodaavalla ilmentämisvektorilla ja soluja viljeltiin sillä tavoin, että niiden oli mahdollista ilmentää dimeeriä. Konsentroidummasta supernatantista (tämä sisälsi eritettyä dimeeriä) määritettiin sen kyky inhiboida radioaktiivisella jodilla varustetun muriini-TNF α :n sitoutumista U937-soluun (tämä on TNF:n endogeenisiä reseptoreita sisältävä humaanimonosyyttiä muistuttava solulinja). Suoritettiin sitoutumis inhibitiomääritys tavantomaisten menetelmien mukaisesti, jotka olivat samanlaiset kuin esimerkin 2 osassa C kuvatut menetelmät. Negatiivisissa kontrollikoeputkissa (epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseen) oli radioaktiivisella leimalla varustamatonta TNF α :aa, U937-soluja ja radioaktiivisella jodilla varustettua TNF α :aa. Positiiviset kontrollikoeputket (inhiboimattomissa olosuhteissa saatavan maksimiarvon määrittämiseksi radioaktiivisella jodilla varustetun TNF α :n sitoutumiselle U937-soluihin) sisälsivät sitoutumismediumia, U937-soluja ja radioaktiivisella jodilla varustettua TNF α :aa. Dimeeriä sisältävä supernatantti inhiboi yli 90 % positiivisella kontrollilla havaitusta TNF:n sitoutumisesta U937-soluihin.

25 **Esimerkki 12**

Yhtä IL-1R-polyeptidiä ja kahta TNF-R-polyeptidiä sisältävä fuusioproteiini

30 Plasmidivektori, jossa on kaavan IL-1R-peptidikytkijäjakso-TNF-R-peptidikytkijäjakso-TNF-R mukaista fuusioproteiinia koodaavaa DNA:ta, konstruoidaan seuraavalla tavalla.

35 Liukoista tyyppin I IL-1R-polyeptidiä koodaava cDNA eristettiin ja monistettiin tunnetulla polymeraasiketjureaktio (PCR) -menetelmällä. Syntetoitiin PCR-reaktiossa alukkeina käytettäviksi tarkoitettut oligonukleotidit, jotka olivat:

jaksotunniste nro 18:

5' ACCGAGGGACCTGAGCG 3'

5 jaksotunniste nro 19:

3' TCAATTATATAGGTCAGTGACCACCGCCACCTAGGCCGCCACCGC
CGCCGAGT 5'

Nämä sekä tuonnempana tarkasteltavat oligonukleotidit syn-
10 tetoidaan tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi käyttäen
automaattista DNA-synteetilaitetta, kuten yhtiöistä Bio-
search, Inc., San Rafael, Kalifornia, tai Applied Biosys-
tems, saatavilla olevia laitteita. PCR-reaktiossa käytetty
15 templaatti on plasmidivektori, joka on valmistettu liit-
tämällä vektoriin tyyppin I humaani-IL-1R:n cDNA ja jolle on
annettu nimitys SF CAV. SF CAV -vektori on kuviossa 5 esi-
tetty nisäkäsilmentämisvektori (tässä on esitetty SF CAV:n
käyttö yhdessä muussa tuonnempana kuvattavassa vektori-
konstruktiossa). E. coli -soluissa oleva SF CAV talletet-
20 tiin 27.2.1992 talletuslaitokseen American Type Culture
Collection Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti ja
sille on annettu hakunumero 68 922.

SF CAV:ssa olevat SV40-, CMV-, pA- ja VA-jaksot
sekä ampisilliiniresistenssigeeni ovat samanlaiset kuin
25 plasmidin pCAV/NOT edellä olevassa esimerkissä 3 kuvatut
jaksot ja myös PCT-patenttihakemusjulkaisun WO 90/05 183
esimerkissä 8 ja kuviossa 3 kuvatut jaksot. Monipaikkainen
kloonauskohta, joka sijaitsee adenovirus-2:n kolmiosaisen
johtojakson (TPL) ja pA-jakson välissä, sisältää restriktio-
30 endonukleaasien XhoI, KpnI, SmaI, NotI ja BglI tunnis-
tuskohdat. TPL-jakso eroaa pCAV/NOT:n TPL-jaksosta siinä,
että SF CAV:n TPL-jaksosta on deletoitu IL-1R:ää koodaavien
vektorien konstruktiolle haitalliseksi arveltu alue. Tämä
haitallinen vaikutus IL-1R-vektoreihin voi mahdollisesti
35 johtua jaksossa olevasta haitallisesta kryptisestä promoot-
torista, josta haitallinen proteiini ilmentyy E. colissa.

Vähäinen humaanii-IL-1R:n ilmentyminen kryptisestä promootorista voi olla toksista bakteereille.

SF CAV pilkottaa SmaI:lla, joka tunnistaa monipaikkaisessa kloonaukohdassa olevan ainutkertaisena esiintyvän restriktiokohdan ja muodostaa tasaiset päät. DNA-fragmentti, joka sisältää tyypin I IL-1R:n cDNA:n, valmistetaan käyttämällä pilkkomista StyI:n ja BglII:n seoksella, jonka jälkeen vapaaksi jääneet päät täytetään käyttäen DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmenttia tasaisten päiden aikaansaamiseksi. StyI:n katkaisukohta on jaksotunnisteen nro 5 nukleotidin 49 kohdalla ja BglII:n katkaisukohta on nukleotidin 1 997 kohdalla. IL-1R:n cDNA-fragmentti ligatoidaan SmaI:llä pilkottuun SF CAV -vektoriin ja E. coli -solut transformoidaan ligaatioseoksella vakiomenetelmillä. Tulokset saatu vektori otetaan talteen E. coli -soluista ja tätä käytetään templaattina PCR-reaktiossa.

5'-puoleinen alue (jaksotunniste nro 18) vastaa sitä 17 nukleotidin suuruista jaksoa, joka esiintyy vektorissa vastasuuntaan vektoriin liitettyyn IL-1R cDNA:han nähden. 3'-puoleinen alue (jaksotunniste nro 19) sisältää segmentin, joka on komplementaarinen jaksotunnisteen nro 5 nukleotidien 1 060 - 1 079 suhteen, jotka koodaavat IL-1R:n solunulkoisen domeenin C-terminaalisen pään lähettyvillä olevia aminohappoja 306 (osittainen kodoni) - 312. Tämä 3'-puoleinen alue sisältää myös peptidikytkijäjaksoa Gly₄SerGly₅Ser koodaavan jakson.

Suoritetaan PCR-reaktio millä tahansa sopivalla menetelmällä, kuten menetelmillä, joita on kuvattu julkaisussa Sarki, et al., Science 239 (1988) 487; teoksessa Recombinant DNA Methodology, Wu, et al., eds., Academic Press Inc., San Diego (1989) pp 189 - 196; sekä teoksessa PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, et al., eds., Academic Press, Inc. (1990). Sopivaa PCR-menetelmää edustava esimerkki on seuraavaksi esitettävä menetelmä. Kaikki lämpötilat on ilmoitettu celsiusasteina. 0,5 ml:n vetoiseen Eppendorf-mikrosentrifugiputkeen lisä-

tään PCR-reagenssit, jotka ovat: 10 µl 10 x PCR-puskuria (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 25 °C:ssa, 25 mM MgCl₂ ja 1 mg gelatiinia millilitrassa) (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CN), 8 µl liuosta, jonka konsentraatio on 2,5 mM ja joka sisältää kutakin dNTP:tä (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP ja 2 mM dTTP), 2,5 yksikköä Taq DNA-polymeraasia (Perkins-Elmer Cetus) (0,5 µl standardiliuosta, jossa on 5 000 yksikköä millilitrassa), 1 ng templaatti-DNA:ta, 100 pikomoolia kutakin oligonukleotidialuketta sekä sellainen määrä vettä, että lopulliseksi tilavuudeksi saadaan 100 µl. Lopullisen seoksen päälle pipetoidaan 100 µl parafiiniöljyä. PCR suoritetaan käyttäen DNA-lämpösykli-inkubointilaitetta (Ericomp, San Diego, CA). Templaatti denaturoidaan 94 °C:ssa 5 minuutta ja PCR suoritetaan käyttäen 25 monistussykliä ja käyttäen vaiheittaista ohjelmaa (denaturaatio 94 °C:ssa, 1,5 minuuttia; yhteenliittäminen pituussuunnassa 60 °C:ssa, 1 minuutti; pidennys 72 °C:ssa 1 minuutti).

Reaktioseoksesta otetun näytteen elektroforeesista 1-%:sessa matalassa lämpötilassa sulavassa (LMT) SeaKem-agarosissa (FMC BioProducts, Rockland, ME) ja etidiumbromidiväryäyksestä saadaan PCR-reaktion tuotteena näkyviin yksi odotettua kokoa oleva DNA-fragmentti. PCR:llä monistettu DNA-fragmentti käsittää lyhyen vektorijakson, joka sisältää Asp718-restriktiokohdan, joka on vastasuuntaan IL-1R:n aminohappoja 1 (Asp) - 312 (Thr) koodaavaan jaksoon nähden ja jonka jälkeen tulee peptidikytkijäjaksoa koodaava yksinauhainen segmentti.

Suoritetaan toinen PCR-reaktio liukoista TNF-R-polypeptidiä koodaavan cDNA-fragmentin eristämiseksi ja monistamiseksi. Templaatti oli vektori, jolle esimerkissä 4 oli annettu nimitys psolhuTNF-R Δ235/CAVNOT ja joka sisältää jaksotunnisteen nro 1 mukaisia TNF-R:n aminohappoja -22 - 235 koodaavan cDNA-liitosjakson. Reaktiossa käytetyt alukkeet ovat:

jaksotunniste nro 20:

5' GGTGGCGGTGGATCCGGCGGTGGCGGCGGCTCATTGCCCGCCCAGGTGGCA 3'

jaksotunniste nro 21:

5 3' TGACGCGCGACTCGTTCG 5'

5'-puoleinen aluke (jaksotunniste nro 20) sisältää peptidikytkijäjaksoa koodaavan segmentin, joka on komplementaarinen jaksotunnisteen numero 19 mukaisen alukkeen peptidikytkijäjaksoa koodaavan osan suhteen. Tätä kytkijäjaksoa koodaavaa segmenttiä seuraa kypsän TNF-R:n kuutta ensimmäistä aminohappoa vastaavat kodonit (Leu-Ala).

3'-puoleinen aluke (jaksotunniste nro 21) sisältää nukleotideja, jotka ovat komplementaarisia TNF-R:n jaksotunnisteen nro 1 mukaisten nukleotidien 461 - 478 suhteen, jotka koodaavat aminohappoja 103 (Tyr, osittainen kodoni) - 109 (Gln, osittainen kodoni). Tähän alukkeeseen sisältyy myös EspI-restriktiokohta, joka esiintyy luontaisesti TNF-R-proteiinin tässä osassa.

20 PCR-reaktio suoritetaan edellä kuvatulla tavalla. Tällä toisella PCR-reaktiolla monistettu DNA-fragmentti sisältää edellä kuvatun kytkijäjaksoa koodaavan segmentin, jota seuraa TNF-R:n aminohappojakso 1 (Leu) - 109 (Gln, osittainen kodoni) koodaava jakso. Tämä DNA-fragmentti visualisoidaan elektroforeesilla, jonka jälkeen geeli värjätään etidiumbromidilla edellä kuvatulla tavalla. Suorite-

25 taan kolmas PCR-reaktio, jolla on tarkoitus eristää sellainen monistettu kaksinauhainen DNA-fragmentti, joka sisältää kytkijäjaksos erottamat IL-1R:n ja TNF-R:n jaksot. 0,5 ml:n vetoiseen koeputkeen yhdistettiin reagenssit, jotka olivat:

30 3 µl (noin 5 - 10 ng) edellä olevassa ensimmäisessä PCR-reaktiossa monistettua IL-1R-peptidikytkijäjakso-DNA-fragmenttia - 3 µl:n suuruinen näyte otetaan suoraan LMT-agarosista mikropipetillä käyttäen UV-valoa etidiumbromidilla värjättyssä geelissä olevan halutun vyöhykkeen visualisointiin

35

3 µl (noin 5 - 10 ng) edellä olevassa toisessa PCR-reaktiossa monistettua peptidikytkijäjakso-TNF-R-DNA-fragmenttia - 3 µl:n suuruinen näyte pipetoidaan mikropipetillä suoraan halutun vyöhykkeen sisältävästä LMT-agarosialu-

5

eesta
10 µl 10 x PCR-puskuria (tämä on kuvattu edellä)
100 pmol 5'-puoleisena alukkeena käytettävää jakso-

tunnisteen nro 18 mukaista oligonukleotidia

100 pmol 3'-puoleisena alukkeena käytettävää jakso-

10

tunnisteen nro 21 mukaista oligonukleotidia

4 µl 2,5-millimolaarista liuosta, joka sisältää kutakin neljää dNTP:tä

0,5 µl Taq-DNA-polymeraasia (5 yksikköä/µl)

vettä lopullisen tilavuuden säätämiseksi 100 µl:ksi

15

PCR-reaktiosykli suoritetaan edellä mainituissa lämpötiloissa ja käyttäen edellä mainittuja aikoja. Aloittaessa käytetyn denaturointivaiheen jälkeen liittyvät näiden kahden DNA-fragmentin komplementaariset peptidikytkijäjaksoja koodaavat segmentit pituussuunnassa yhteen. Reaktion lopputuote on tasaiset päät sisältävä kaksinauhainen monistettu DNA-fragmentti, jonka pituus on noin 1 370 ep ja joka sisältää peptidikytkijäjaksoa koodaavaan jaksoon nähden vastasuunnassa olevan IL-1R:n DNA-jakson ja näiden jälkeen tulevan TNF-R:n DNA-jakson.

20

25

Tästä kolmannelta PCR-reaktioosoksesta oleva 25 µl:n suuruinen näyte saatetaan reagoimaan puhdistamattomana restriktioentsyymien Asp718 ja EspI kanssa. Asp 718:n katkaisukohta on, kuten edellä jo mainittiin, vastasuunnassa IL-1R-jakson edellä. EspI:n katkaisukohta on TNF-R-jakson sisällä kuten kuviosta 2A ja edellä olevasta tarkastelusta käy ilmi. Restriktioendonukleaasi Cell II on EspI:n isoskitsomeeri ja sitä voidaan käyttää EspI:n tilalla. Haluttu fragmentti, josta tuonnempana käytetään nimitystä fragmentti E, puhdistetaan tavanomaisin menetelmin, kuten erot-

30

35

tamalla se geelielektroforeesilla, esimerkiksi matalassa lämpötilassa sulavassa 1,0-%:isessa Seaplaque-agarosii-

geelissä ja eristämällä haluttua fragmenttia edustava vyöhyke.

Eristetään kaksi muuta DNA-fragmenttia, joille on annettu nimetykset F ja G, ja nämä yhdistetään fragmenttiin E sellaisen ilmentämisvektorin konstruoimiseksi, jossa on toinen TNF-R-jakso, joka on liitetty (peptidikytkijäjakson välityksellä) myötäsuuntaan edellä olevan esityksen mukaisesti valmistetun IL-1R-kytkijäjakso-TNF-R-DNA-fragmentin suhteen. Tulokseksi saatava vektori ja sen sisältämät fragmentit E, F ja G on esitetty kuviossa 4.

DNA-fragmentti, josta on käytetty nimitystä F, valmistetaan pilkkomalla kuviossa 3 esitetty ja esimerkissä 11 konstruoitu vektori EspI:lla. Eristetään fragmentti, joka sisältää TNF-R:n 3'-puoleisen osan (tämä ulottuu kuviossa 2A esitetystä EspI-kohdasta aminohappoa 235 vastaavaan kodoniin), tämän jälkeen tulevan Gly₄SerGly₅Ser-peptidikytkijäjaksoa koodaavan jakson ja tämän jälkeisen toisen TNF-R-jakson, joka ulottuu aminohappoa 1 (Leu) vastaavasta kodonista kuvion 3 mukaisen vektorin toisessa (myötäsuuntaan olevassa) TNF-R-jaksossa olevaan EspI-kohtaan. Tästä fragmentista, jonka pituus on noin 739 emäsparia, on tuonnempana käytetty nimitystä fragmentti F.

Fragmentti G, joka sisältää vektorin jaksoja (mukaan lukien DHFR:n) sekä TNF-R-jakson 3'-puoleisen osan, eristetään "silmukoitunutta muotoa sisältämättömästä" vektorista seuraavalla tavalla. Esimerkissä 11 valmistettu pCAV/DHFR/TNF-R-vektori sisältää jakson, jonka arvellaan olevan epäedullinen IL-1R:ää koodaavien vektorien konstruktiolle, mikä johtuu mahdollisesti tässä jaksossa olevasta kryptisestä promoottorista, josta haitallinen proteiini ilmenee E. colissa. Valmistettiin pCAV/DHFR/TNF-R:n johdannainen korvaamalla haitallisen jakson sisältävä NdeI/Asp 718 -vektorifragmentti silmukoitunutta muotoa sisältämättömästä vektorista SF CAV (ATCC 68 922, tämä on kuvattu edellä) peräisin olevalla NdeI/Asp 718 -fragmentilla. Tämä konstruktio on esitetty kuviossa 5.

SF CAV pilkotaan NdeI:lla ja Asp 718:lla (ainutkertaista esiintyvät kohdat tässä plasmidissa) ja eristetään kuviossa 5 oleva noin 500 ep:n suuruinen fragmentti, josta on käytetty nimitystä H. Fragmentista H puuttuu pCAV/DHFR/TNF-R:n vastaavassa fragmentissa esiintyvä haitallinen jakso.

Esimerkissä 11 valmistettu ja kuviossa 5 esitetty pCAV/DHFR/TNF-R-vektori pilkotaan Asp 718:lla, EspI:lla ja NdeI:lla. Eristetään noin 495 ep:n suuruinen Asp 718/EspI-fragmentti (fragmentti I). Eristetään myös noin 4 647 ep:n suuruinen NdeI/EspI-fragmentti (fragmentti J).

Edellä olevan esityksen mukaan valmistetut DNA-fragmentit H, I ja J ligatoidaan toisiinsa kuviossa 5 esitetyn vektorin SF CAV/DHFR/TNF-R muodostamiseksi, joka ei sisällä silmukoitunutta muotoa. E. coli -solut transformoidaan ligaatioseoksella tavanomaisia menetelmiä käyttäen. Plasmidi-DNA otetaan talteen isäntäsoluista ja haluttu konstruktio varmistetaan oikeaksi restriktioanalyysillä. Tämän jälkeen SF pCAV/DHFR/TNF-R pilkotaan Asp 718:lla ja EspI:lla. Fragmentti, josta kuviossa 5 on käytetty nimitystä G, sisältää vektorin jaksoja (mukaan lukien DHFR:n) ja TNF-R:n jakson 3'-puoleisen pään (sisäisestä EspI-kohdasta aminohappoa 235 koodaavaan kodoniin ja tätä seuraavaan lopetuskodoniin asti) ja se eristetään tavanomaisin menetelmin.

Edellä valmistetut DNA-fragmentit E, F ja G ligatoidaan toisiinsa sellaisen vektorin muodostamiseksi, joka on esitetty kuviossa 4 (ja jolle on annettu nimitys SF CAV DHFR tri-R). E. coli -solut transformoidaan ligaatioseoksella ja haluttu plasmidi otetaan talteen edellä kuvatulla tavalla. Tämän vektorin koodaama fuusioproteiini (N-terminaalisisestä päästä C-terminaaliseen päähän lueteltuna) sisältää tyypin I IL-1R:n aminohapot -20 - 312 (jaksotunniste nro 5); Gly₄SerGly₅Ser-peptidikytkijäjakson; TNF-R:n aminohapot 1 - 235 (jaksotunniste nro 1); Gly₄SerGly₅Ser-pepti-

dikytkijäjakson; ja toisen TNF-R-polyeptidin, joka sisältää jaksotunnisteen nro 1 mukaiset aminohapot 1 - 235.

Nisäkäs-soluja transfektoidaan ilmentämisvektorilla tavanomaisia menetelmiä käyttäen ja niitä viljellään halutun fuusioproteiinin tuottamiseksi. Yksi sopiva nisäkäs-solulinja on CHO-K1:ksi nimitetty kiinanhamsterin munasarjasolulinja, joka on tyypiltään DHFR⁻ ja joka on saatavilla talletuslaitoksesta American Type Culture Collection, Rockville, MD, hakunumerolla CCL 61. Solut voidaan transfektoida ilmentämisvektorilla tavanomaista kalsiumfosfaattisaostusta käyttäen menetellen olennaisesti julkaisussa Graham ja van der Eb, Virology 52 (1983) 456, kuvatulla tavalla. Transfektoituja soluja viljellään sopivissa tavanomaisissa olosuhteissa ja halutun fuusioproteiinin esiintyminen soluviljelymediumissa varmistetaan määrityksillä, kuten esimerkeissä 1 ja 2 kuvatuilla määrityksillä.

Edellä kuvatulla tavalla konstruoidun ilmentämisvektorin DNA-sekvenssoinnissa tuli fuusioproteiinia koodaavissa jaksoissa ilmi kaksi pistemutaatiota, jotka ovat saattaneet ilmaantua PCR:n aikana. Jaksotunnisteen nro 5 (tyypin I IL-1R) asemassa 437 oleva "T" oli vaihtunut "C":ksi ja jaksotunnisteen nro 1 (TNF-R) asemassa 687 oleva "C" oli vaihtunut "T":ksi. Nämä mutaatiot ovat vaikutuksettomia, joten IL-1R-peptidikytkijäjakso-TNF-R-peptidikytkijäjakso-TNF-R-fuusioproteiinin (josta tuonnempana käytetään nimitystä "trimeerinen reseptori") aminohappojakso on edellä esitetyn kuvauksen mukainen.

Tällä ilmentämisvektorilla transfektoitiin COS-7-soluja ja soluja viljeltiin sillä tavoin, että trimeerisen reseptorin oli mahdollista ilmentyä. Viisinkertaisesti kon-sentroidusta supernatantista (tämä sisälsi eritettyä tri-meeristä reseptoriproteiinia) määritettiin sen kyky inhi-boida radioaktiivisella jodilla varustetun muriini-TNF α :n (0,5 nM) sitoutuminen U937-soluihin (tämä on endogeenisiä TNF-reseptoreja sisältävä monosyyttityyppinen humaanisolulinja). Suoritettiin sitoutumisinhibitio-määritys käyttäen

tavanomaisia menetelmiä, jotka olivat samanlaiset kuin esi-
 merkin 2 osassa C kuvatut menetelmät. Negatiiviset kontrol-
 likoeputket (epäspesifisen sitoutumisen määrittämiseksi)
 sisälsivät TNF α :aa, josta puuttui radioaktiivinen leima,
 5 U937-soluja ja radioaktiivisella jodilla varustettua
 TNF α :aa. Positiiviset kontrollikoeputket (inhiboimattomissa
 olosuhteissa saatavan maksimiarvon määrittämiseksi radio-
 aktiivisella jodilla varustetun TNF α :n sitoutumiselle U937-
 soluihin) sisälsivät sitoutumismediumia, U937-soluja ja ra-
 10 dioaktiivisella jodilla varustettua TNF α :aa. Trimeeristä
 reseptoria sisältävä supernatantti inhiboi TNF:n sitoutu-
 mista U937-soluihin noin 100-%:sesti positiivisessa kon-
 trollissa havaittuun sitoutumiseen verrattuna.

Viisinkertaisesti konsentroidusta supernatantista,
 15 joka sisälsi trimeeristä reseptoria, määritettiin myös sen
 kyky inhiboida radioaktiivisella jodilla varustetun humaa-
 ni-IL-1 α :n (0,14 nM) sitoutuminen endogeenisiä IL-1-resep-
 toreja sisältäviin EL4 6.1 -soluihin. EL4 6.1 -solulinja on
 valmistettu muriinityoomasolulinjasta julkaisussa Mac-
 20 Donald, et al. [J. Immunol. 135 (1985) 3944] kuvatulla ta-
 valla. Negatiivisissa kontrollikoeputkissa (epäspesifisen
 sitoutumisen määrittämiseksi) oli IL-1 α :aa, jossa ei ollut
 radioaktiivista leimaa, EL4 6.1 -soluja ja radioaktiivi-
 25 sella jodilla varustettua IL-1 α :aa. Positiivisissa kontrol-
 likoeputkissa (inhiboimattomissa olosuhteissa saatavan mak-
 simiarvon määrittämiseksi radioaktiivisella jodilla varus-
 tetun IL-1 α :n sitoutumiselle EL4 6.1 -soluihin) oli sitou-
 tumismediumia, EL4 6.1-soluja ja radioaktiivisella jodilla
 varustettua IL-1 α :aa. Trimeeristä reseptoria sisältävä su-
 30 pernatantti inhiboi 47 % IL-1:n sitoutumisesta EL4 6.1 -so-
 luihin positiivisessa kontrollissa havaittuun sitoutumiseen
 verrattuna. Monomeerista liukoista tyyppin I IL-1R:ää ilmen-
 tävistä COS-7-soluista peräisin oleva supernatantti, josta
 tehtiin määrittäminen kontrolliksi, inhiboi 52 % siitä IL-1:n
 35 sitoutumisesta EL4 6.1 -soluihin, joka havaittiin positii-
 visen kontrollin kyseessä ollessa.

Esimerkki 13**Yhtä IL-1R-polypeptidiä ja yhtä TNF-R-polypeptidiä sisältävä fuusioproteiini (vertailu)**

Esimerkissä 12 valmistetut fragmentit E ja G voidaan ligatoida toisiinsa vektorin muodostamiseksi, joka sisältää kaavan IL-1R-peptidikytkijäjakso-TNF-R, jossa peptidikytkijäjakso on Gly₄SerGly₅Ser, mukaista fuusioproteiinia koodaavan DNA-jakson. IL-1R ja TNF-R ovat esimerkissä 12 kuvattuja liukoisia polypeptidejä. Esimerkin 12 mukainen fuusioproteiini on edullinen siitä syystä, että TNF:n sitoutuminen saadaan tapahtumaan tehokkaasti, kun yhden TNF-R-polypeptidin tilalla käytetään kahta TNF-R-polypeptidiä.

Tällä ilmentämisvektorilla transfektoitiin COS-7-soluja ja niitä viljeltiin siten, että IL-1R-peptidikytkijäjakso-TNF-R-fuusioproteiinin oli mahdollista ilmentyä. Viisinkertaisesti konsentroidusta supernatantista (tämä sisälsi eritettyä fuusioproteiinia) määritettiin sen kyky inhiboida radioaktiivisella jodilla varustetun humaani-IL-1 α :n (0,14 nM) sitoutumista EL4 6.1 -soluihin (esimerkissä 12 kuvattu muriinityoomasta peräisin oleva IL-1-reseptoreita sisältävä solulinja). Käytetty sitoutumisinhibition määrittäminen oli samanlainen kuin esimerkin 2 osassa C kuvattu menetelmä ja positiiviset ja negatiiviset kontrollit olivat esimerkissä 12 kuvattujen kontrollien mukaiset. Fuusioproteiinia sisältävä supernatantti inhiboi 53 % positiiviselle kontrollille havaitusta IL-1:n sitoutumisesta EL4 6.1 -soluihin.

Muut fuusioproteiinit

Alan ammattikokemuksen perusteella on selvää, että tässä kuvattuja menetelmiä voidaan käyttää muiden fuusioproteiinien valmistamiseksi, jotka ovat muuntuyppisiä kuin edellä olevissa esimerkeissä esitetyt sovellutusmuodot. Peptidikytkijäjaksoa voidaan esimerkiksi muuttaa syntetisellä erilaista peptidikytkijäjaksoa koodaava oligonukleotidi. Lisäksi voidaan eristää vaihtoehtoisia IL-1R- tai TNF-R-proteiinien fragmentteja käyttämällä PCR-alukkeita,

joiden halutaan liittyvän pituussuunnassa johonkin muuhun kuvattujen DNA-jaksojen osaan, mikä siten määrää halutun fragmentin terminaaliset päät. DNA-fragmentin terminaalisen pään uudelleenmuodostamiseen käytettyihin oligonukleotideihin (esimerkiksi esimerkissä 4 käytetty oligonukleotidi) voidaan tehdä muutoksia lopetuskodonin sijoittamiseksi minkä tahansa halutun aminohapon jälkeen. Lisäksi ilmentämisvektorin valinta on riippuvainen käytettäväksi aiotuista isäntäsoluista.

10 **Jaksotunnisteiden pääpiirteittäinen kuvaus**

Jaksotunnisteessa numero 1 ja jaksotunnisteessa numero 2 on esitetty humaani-TNF-R:n cDNA:n nukleotidijakso ja sen koodaama aminohappojakso. Kypsä proteiini rajoittuu aminohappoihin 1 - 439. Signaalipeptidi rajoittuu aminohappoihin -22 - -1. Transmembraanialue rajoittuu aminohappoihin 236 - 265.

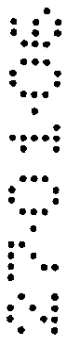
Jaksotunnisteissa nro 3 ja nro 4 on esitetty humaani-TNF-R:n cDNA:n nukleotidijakso ja sen koodaama aminohappojakso. Tämä TNF-R on eri proteiini kuin jaksotunnisteiden nro 1 ja 2 mukainen TNF-R. Kypsä proteiini rajoittuu aminohappoihin 1 - 415. Signaalipeptidi rajoittuu aminohappoihin -40 - -1. Transmembraanialue rajoittuu aminohappoihin 172 - 192.

Jaksotunnisteessa nro 5 ja jaksotunnisteessa nro 6 on esitetty tyypin I humaani-IL-1R:n cDNA:n nukleotidijakso ja sen koodaama aminohappojakso. Kypsä proteiini rajoittuu aminohappoihin 1 - 549. Ennustettu signaalipeptidi rajoittuu aminohappoihin -20 - -1. Transmembraanialue rajoittuu aminohappoihin 317 - 336.

Jaksotunnisteessa nro 7 ja jaksotunnisteessa nro 8 on esitetty tyypin II humaani-IL-1R:n cDNA:n nukleotidijakso ja sen koodaama aminohappojakso. Kypsä proteiini rajoittuu aminohappoihin 1 - 385. Ennustettu signaalipeptidi rajoittuu aminohappoihin -13 - -1. Transmembraanialue rajoittuu aminohappoihin 331 - 356.

Jaksotunnisteissa nro 9 - 15 ja 18 - 21 on kuvattu oligonukleotidit, joita on käytetty useiden erilaisten sellaisten yhdistelmä-plasmidien konstruoimiseen, jotka on kuvattu esimerkkejä käsittelevässä osassa.

- 5 Jaksotunnisteet nro 16 ja 17 esittävät sellaista oligonukleotidijaksoa ja tämän koodaamaa aminohappojaksoa, joka sisältää Gly₄SerGly₅Ser-peptidikytkijäjakson. Tätä oligonukleotidia käytetään esimerkissä 11 kuvatussa vektorikonstruktiossa.



SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Smith, Craig A.
- (ii) TITLE OF INVENTION: Fusion Proteins Comprising Tumor Necrosis Factor Receptor
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 21
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: Immunex Corporation
 - (B) STREET: 51 University Street
 - (C) CITY: Seattle
 - (D) STATE: Washington
 - (E) COUNTRY: U.S.A.
 - (F) ZIP: 98101
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: US 479,661
 - (B) FILING DATE: 07-FEB-1990
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: US 523,635
 - (B) FILING DATE: 10-MAY-1990
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: US 701,415
 - (B) FILING DATE: 16-JUN-1991
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER: US 821,716
 - (B) FILING DATE: 14-JAN-1992
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: Seese, Kathryn A.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 32,172
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 2502
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: (206) 587-0430
 - (B) TELEFAX: (206) 587-0606

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 1641 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
-

(C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Homo sapiens
 (G) CELL TYPE: Fibroblast
 (H) CELL LINE: WI-26 VA4

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: WI-26 VA4
 (B) CLONE: 1

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 88..1473

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
 (B) LOCATION: 154..1470

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide
 (B) LOCATION: 88..153

(x) PUBLICATION INFORMATION:

(A) AUTHORS: Smith, Craig A.
 Davis, Terri
 Anderson, Dirk
 Solam, Lisabeth
 Beckmann, M. P.
 Jerzy, Rita
 Dower, Steven K.
 Cosman, David
 Goodwin, Raymond G.

(B) TITLE: A Receptor for Tumor Necrosis Factor Defines
 an Unusual Family of Cellular and Viral Proteins

(C) JOURNAL: Science

(D) VOLUME: 248

(F) PAGES: 1019-1023

(G) DATE: 25-MAY-1990

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

```

GCGAGGCAGG CAGCCTGGAG AGAAGGCGCT GGGCTGCGAG GCGCGAGGG CCGGAGGGCA      60
GGGGGCAACC GGACCCCGCC CGCATCC ATG GCG CCC GTC GCC GTC TGG GCC      111
                Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala
                -22      -20                -15

GCG CTG GCC GTC GGA CTG GAG CTC TGG GCT GCG GCG CAC GCC TTG CCC      159
Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro
                -10                -5
  
```

GCC Ala	CAG Gln	GTG Val	GCA Ala	TTT Phe	ACA Thr	CCC Pro	TAC Tyr	GCC Ala	CCG Pro	GAG Glu	CCC Pro	GGG Gly	AGC Ser	ACA Thr	TGC Cys	207
		5					10					15				
CGG Arg	CTC Leu	AGA Arg	GAA Glu	TAC Tyr	TAT Tyr	GAC Asp	CAG Gln	ACA Thr	GCT Ala	CAG Gln	ATG Met	TGC Cys	TGC Cys	AGC Ser	AAA Lys	255
	20					25					30					
TGC Cys	TCG Ser	CCG Pro	GGC Gly	CAA Gln	CAT His	GCA Ala	AAA Lys	GTC Val	TTC Phe	TGT Cys	ACC Thr	AAG Lys	ACC Thr	TCG Ser	GAC Asp	303
	35				40					45					50	
MCC Thr	GTG Val	TGT Cys	GAC Asp	TCC Ser	TGT Cys	GAG Glu	GAC Asp	AGC Ser	ACA Thr	TAC Tyr	ACC Thr	CAG Gln	CTC Leu	TGG Trp	AAC Asn	351
				55					60					65		
TGG Trp	GTT Val	CCC Pro	GAG Glu	TGC Cys	TTG Leu	AGC Ser	TGT Cys	GGC Gly	TCC Ser	CGC Arg	TGT Cys	AGC Ser	TCT Ser	GAC Asp	CAG Gln	399
			70					75					80			
GTG Val	GAA Glu	ACT Thr	CAA Gln	GCC Ala	TGC Cys	ACT Thr	CGG Arg	GAA Glu	CAG Gln	AAC Asn	CGC Arg	ATC Ile	TGC Cys	ACC Thr	TGC Cys	447
			85				90					95				
AGG Arg	CCC Pro	GGC Gly	TGG Trp	TAC Tyr	TGC Cys	GCG Ala	CTG Leu	AGC Ser	AAG Lys	CAG Gln	GAG Glu	GGG Gly	TGC Cys	CGG Arg	CTG Leu	495
	100					105					110					
TGC Cys	GCG Ala	CCG Pro	CTG Leu	CTG Asn	GAG Lys	TGC Cys	CGC Arg	CCG Pro	GGC Gly	TTC Phe	GGC Gly	GTG Val	GCC Ala	AGA Arg	CCA Pro	543
	115				120					125					130	
GGA Gly	ACT Thr	GAA Glu	ACA Thr	TCA Ser	GAC Asp	GTG Val	GTG Val	TGC Cys	AAG Lys	CCC Pro	TGT Cys	GCC Ala	CCG Pro	GGG Gly	ACG Thr	591
				135					140					145		
TTC Phe	TCC Ser	AAC Asn	ACG Thr	ACT Thr	TCA Ser	TCC Ser	ACG Thr	GAT Asp	ATT Ile	TGC Cys	AGG Arg	CCC Pro	CAC His	CAG Gln	ATC Ile	639
				150				155					160			
TGT Cys	AAC Asn	GTG Val	GTG Val	GCC Ala	ATC Ile	CCT Pro	GGG Gly	AAT Asn	GCA Ala	AGC Ser	ATG Met	GAT Asp	GCA Ala	GTC Val	TGC Cys	687
		165					170					175				
ACG Thr	TCC Ser	ACG Thr	TCC Ser	CCC Pro	ACC Thr	CGG Arg	AGT Ser	ATG Met	GCC Ala	CCA Pro	GGG Gly	GCA Ala	GTA Val	CAC His	TTA Leu	735
	180					185					190					
CCC Pro	CAG Gln	CCA Pro	GTG Val	TCC Ser	ACA Thr	CGA Arg	TCC Ser	CAA Gln	CAC His	ACG Thr	CAG Gln	CCA Pro	ACT Thr	CCA Pro	GAA Glu	783
	195				200					205					210	
CCC Pro	AGC Ser	ACT Thr	GCT Ala	CCA Pro	AGC Ser	ACC Thr	TCC Ser	TTC Phe	CTG Leu	CTC Leu	CCA Pro	ATG Met	GGC Gly	CCC Pro	AGC Ser	831
			215						220				225			
CCC Pro	CCA Pro	GCT Ala	GAA Glu	GGG Gly	AGC Ser	ACT Thr	GGC Gly	GAC Asp	TTC Phe	GCT Ala	CTT Leu	CCA Pro	GTT Val	GGG Gly	CTG Leu	879
			230				235						240			

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
 235 240 245 250
 Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
 255 260 265
 Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
 270 275 280
 Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
 285 290 295
 Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
 300 305 310
 Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
 315 320 325 330
 Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
 335 340 345
 Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
 350 355 360
 Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
 365 370 375
 Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
 380 385 390
 Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
 395 400 405 410
 Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
 415 420 425
 Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 430 435

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1368 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: HOMO SAPIENS

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (B) CLONE: lambda-gt10-7ctnfbp

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 1..1366

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
 (B) LOCATION: 121..1363

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide
 (B) LOCATION: 1..120

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

ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCG CTG GTG CTC CTG	48
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu	
-40 -35 -30 -25	
GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT	96
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro	
-20 -15 -10	
CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA	144
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys	
-5 1 5	
TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA	192
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys	
10 15 20	
GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC	240
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp	
25 30 35 40	
TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC	288
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu	
45 50 55	
AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG	336
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val	
60 65 70	
GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG	384
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg	
75 80 85	
AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC	432
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe	
90 95 100	
AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG	480
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu	
105 110 115 120	
AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA	528
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu	
125 130 135	

AAC	GAG	TGT	GTC	TCC	TGT	AGT	AAC	TGT	AAG	AAA	AGC	CTG	GAG	TGC	ACG	576
Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr	
			140					145					150			
AAG	TTG	TGC	CTA	CCC	CAG	ATT	GAG	AAT	GTT	AAG	GGC	ACT	GAG	GAC	TCA	624
Lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser	
		155					160					165				
GGC	ACC	ACA	GTG	CTG	TTG	CCC	CTG	GTC	ATT	TTC	TTT	GGT	CTT	TGC	CTT	672
Gly	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Leu	
	170					175					180					
TTA	TCC	CTC	CTC	TTC	ATT	GGT	TTA	ATG	TAT	CGC	TAC	CAA	CGG	TGG	AAG	720
Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Ile	Gly	Leu	Met	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Arg	Trp	Lys	
185					190				195						200	
TCC	AAG	CTC	TAC	TCC	ATT	GTT	TGT	GGG	AAA	TCG	ACA	CCT	GAA	AAA	GAG	768
Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Cys	Gly	Lys	Ser	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	
				205				210						215		
GGG	GAG	CTT	GAA	GGA	ACT	ACT	ACT	AAG	CCC	CTG	GCC	CCA	AAC	CCA	AGC	816
Gly	Glu	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Ala	Pro	Asn	Pro	Ser	
			220					225					230			
TTC	AGT	CCC	ACT	CCA	GGC	TTC	ACC	CCC	ACC	CTG	GGC	TTC	AGT	CCC	GTG	864
Phe	Ser	Pro	Thr	Pro	Gly	Phe	Thr	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ser	Pro	Val	
		235					240					245				
CCC	AGT	TCC	ACC	TTC	ACC	TCC	AGC	TCC	ACC	TAT	ACC	CCC	GGT	GAC	TGT	912
Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Asp	Cys	
	250					255					260					
CCC	AAC	TTT	GCG	GCT	CCC	CGC	AGA	GAG	GTG	GCA	CCA	CCC	TAT	CAG	GGG	960
Pro	Asn	Phe	Ala	Ala	Pro	Arg	Arg	Glu	Val	Ala	Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	
265					270			275							280	
GCT	GAC	CCC	ATC	CTT	GCG	ACA	GCC	CTC	GCC	TCC	GAC	CCC	ATC	CCC	AAC	1008
Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	
			285					290						295		
CCC	CTT	CAG	AAG	TGG	GAG	GAC	AGC	GCC	CAC	AAG	CCA	CAG	AGC	CTA	GAC	1056
Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala	His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	
			300					305					310			
ACT	GAT	GAC	CCC	GCG	ACG	CTG	TAC	GCC	GTG	GTG	GAG	AAC	GTG	CCC	CCG	1104
Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	
		315					320					325				
TTG	CGC	TGG	AAG	GAA	TTC	GTG	CGG	CGC	CTA	GGG	CTG	AGC	GAC	CAC	GAG	1152
Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	His	Glu	
	330					335					340					
ATC	GAT	CGG	CTG	GAG	CTG	CAG	AAC	GGG	CGC	TGC	CTG	CGC	GAG	GCG	CAA	1200
Ile	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Gln	
345					350					355					360	
TAC	AGC	ATG	CTG	GCG	ACC	TGG	AGG	CGG	CGC	ACG	CCG	CGG	CGC	GAG	GCC	1248
Tyr	Ser	Met	Leu	Ala	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Glu	Ala	
				365					370					375		

ACG CTG GAG CTG CTG GGA CGC GTG CTC CGC GAC ATG GAC CTG CTG GGC 1296
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 380 385 390

TGC CTG GAG GAC ATC GAG GAG GCG CTT TGC GGC CCC GCC GCC CTC CCG 1344
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 395 400 405

CCC GCG CCC AGT CTT CTC AGA TGA 1368
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 410 415

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 455 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 -40 -35 -30 -25

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
 -20 -15 -10

His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
 -5 1 5

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
 10 15 20

Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 25 30 35 40

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 45 50 55

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 60 65 70

Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 75 80 85

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 90 95 100

Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 105 110 115 120

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 125 130 135

Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 140 145 150

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 155 160 165
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 170 175 180
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 185 190 195 200
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 205 210 215
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 220 225 230
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
 235 240 245
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
 250 255 260
 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 265 270 275 280
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
 285 290 295
 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
 300 305 310
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
 315 320 325
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
 330 335 340
 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 345 350 355 360
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
 365 370 375
 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
 380 385 390
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro
 395 400 405
 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
 410 415

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 3011 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Homo sapiens
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: HUIL-1R
- (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 84..1793
- (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 144..1790
- (ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 84..143

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

```

AGACGCACCC TCTGAAGATG GTGGACTCCC TCCTGAGAAG CTGGGACCCC TTGGTAAAAG      60
ACAAGGCCTT CTCCAAGAAG AAT ATG AAA GTG TTA CTC AGA CTT ATT TGT      110
                Met Lys Val Leu Leu Arg Leu Ile Cys
                -20                      -15

TTC ATA GCT CTA CTG ATT TCT TCT CTG GAG GCT GAT AAA TGC AAG GAA      158
Phe Ile Ala Leu Leu Ile Ser Ser Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu
-10                      -5                      1                      5

CGT GAA GAA AAA ATA ATT TTA GTG TCA TCT GCA AAT GAA ATT GAT GTT      206
Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val
                10                      15                      20

CGT CCC TGT CCT CTT AAC CCA AAT GAA CAC AAA GGC ACT ATA ACT TGG      254
Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys Gly Thr Ile Thr Trp
                25                      30                      35

TAT AAA GAT GAC AGC AAG ACA CCT GTA TCT ACA GAA CAA GCC TCC AGG      302
Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg
                40                      45                      50

ATT CAT CAA CAC AAA GAG AAA CTT TGG TTT GTT CCT GCT AAG GTG GAG      350
Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu
                55                      60                      65

GAT TCA GGA CAT TAC TAT TGC GTG GTA AGA AAT TCA TCT TAC TGC CTC      398
Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Leu
                70                      75                      80                      85

AGA ATT AAA ATA AGT GCA AAA TTT GTG GAG AAT GAG CCT AAC TTA TGT      448
Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn Glu Pro Asn Leu Cys
                90                      95                      100

```

TAT AAT GCA CAA GCC ATA TTT AAG CAG AAA CTA CCC GTT GCA GGA GAC	494
Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu Pro Val Ala Gly Asp	
105 110 115	
GGA GGA CTT GTG TGC CCT TAT ATG GAG TTT TTT AAA AAT GAA AAT AAT	542
Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn	
120 125 130	
GAG TTA CCT AAA TTA CAG TGG TAT AAG GAT TGC AAA CCT CTA CTT CTT	590
Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu	
135 140 145	
GAC AAT ATA CAC TTT AGT GGA GTC AAA GAT AGG CTC ATC GTG ATG AAT	638
Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu Ile Val Met Asn	
150 155 160 165	
GTG GCT GAA AAG CAT AGA GGG AAC TAT ACT TGT CAT GCA TCC TAC ACA	686
Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr	
170 175 180	
TAC TTG GGC AAG CAA TAT CCT ATT ACC CGG GTA ATA GAA TTT ATT ACT	734
Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr	
185 190 195	
CTA GAG GAA AAC AAA CCC ACA AGG CCT GTG ATT GTG AGC CCA GCT AAT	782
Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn	
200 205 210	
GAG ACA ATG GAA GTA GAC TTG GGA TCC CAG ATA CAA TTG ATC TGT AAT	830
Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn	
215 220 225	
GTC ACC GGC CAG TTG AGT GAC ATT GCT TAC TGG AAG TGG AAT GGG TCA	878
Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser	
230 235 240 245	
GTA ATT GAT GAA GAT GAC CCA GTG CTA GGG GAA GAC TAT TAC AGT GTG	926
Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val	
250 255 260	
GAA AAT CCT GCA AAC AAA AGA AGG AGT ACC CTC ATC ACA GTG CTT AAT	974
Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn	
265 270 275	
ATA TCG GAA ATT GAA AGT AGA TTT TAT AAA CAT CCA TTT ACC TGT TTT	1022
Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe	
280 285 290	
GCC AAG AAT ACA CAT GGT ATA GAT GCA GCA TAT ATC CAG TTA ATA TAT	1070
Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr	
295 300 305	
CCA GTC ACT AAT TTC CAG AAG CAC ATG ATT GGT ATA TGT GTC ACG TTG	1112
Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys His Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu	
310 315 320 325	
ACA GTC ATA ATT GTG TGT TCT GTT TTC ATC TAT AAA ATC TTC AAG ATT	1166
Thr Val Ile Ile Val Cys Ser Val Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile	
330 335 340	

GAC ATT GTG CTT TGG TAC AGG GAT TCC TGC TAT GAT TTT CTC CCA ATA	1214
Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp Ser Cys Tyr Asp Phe Leu Pro Ile	
345 350 355	
AAA GCT TCA GAT GGA AAG ACC TAT GAC GCA TAT ATA CTG TAT CCA AAG	1262
Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Tyr Ile Leu Tyr Pro Lys	
360 365 370	
ACT GTT GGG GAA GGG TCT ACC TCT GAC TGT GAT ATT TTT GTG TTT AAA	1310
Thr Val Gly Glu Gly Ser Thr Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys	
375 380 385	
GTC TTG CCT GAG GTC TTG GAA AAA CAG TGT GGA TAT AAG CTG TTC ATT	1358
Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile	
390 395 400 405	
TAT GGA AGG GAT GAC TAC GTT GGG GAA GAC ATT GTT GAG GTC ATT AAT	1406
Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn	
410 415 420	
GAA AAC GTA AAG AAA AGC AGA AGA CTG ATT ATC ATT TTA GTC AGA GAA	1454
Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu	
425 430 435	
ACA TCA GGC TTC AGC TGG CTG GGT GGT TCA TCT GAA GAG CAA ATA GCC	1502
Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala	
440 445 450	
ATG TAT AAT GCT CTT GTT CAG GAT GGA ATT AAA GTT GTC CTG CTT GAG	1550
Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu	
455 460 465	
CTG GAG AAA ATC CAA GAC TAT GAG AAA ATG CCA GAA TCG ATT AAA TTC	1598
Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe	
470 475 480 485	
ATT AAG CAG AAA CAT GGG GCT ATC CGC TGG TCA GGG GAC TTT ACA CAG	1646
Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln	
490 495 500	
GGA CCA CAG TCT GCA AAG ACA AGG TTC TGG AAG AAT GTC AGG TAC CAC	1694
Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His	
505 510 515	
ATG CCA GTC CAG CGA CGG TCA CCT TCA TCT AAA CAC CAG TTA CTG TCA	1742
Met Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser	
520 525 530	
CCA GCC ACT AAG GAG AAA CTG CAA AGA GAG GCT CAC GTG CCT CTC GGG	1790
Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly	
535 540 545	
TAGCATGGAG AAGTTGCCAA GAGTTCCTTA GGTGCCTCCT GTCTTATGGC GTTGCAGGCC	1850
AGGTTATGCC TCATGCTGAC TTGCAGAGTT CATGGAATGT AACTATATCA TCCTTTATCC	1910
CTGAGGTCAC CTGGAATCAG ATTATTAAGG GAATAAGCCA TGACGTCAAT AGCAGCCAG	1970
GGCACTTCAG AGTAGAGGGC TTGGGAAGAT CTTTTAAAA GGCAGTAGGC CCGGTGTGGT	2030

GGCTCACGCC TATAATCCCA GCACTTTGGG AGGCTGAAGT GGGTGGATCA CCAGAGGTCA 2090
 GGAGTTCGAG ACCAGCCCAG CCAACATGGC AAAACCCCAT CTCTACTAAA AATACAAAAA 2150
 TGAGCTAGGC ATGGTGGCAC ACGCCTGTAA TCCCAGCTAC ACCTGAGGCT GAGGCAGGAG 2210
 AATTGCTTGA ACCGGGGAGA CGGAGGTTGC AGTGAGCCGA GTTGGGCCA CTGCACTCTA 2270
 GCCTGGCAAC AGAGCAAGAC TCCGTCTCAA AAAAAGGGCA ATAAATGCCC TCTCTGAATG 2330
 TTTGAACTGC CAAGAAAAGG CATGGAGACA GCGAAGTAGA AGAAAGGGCA AGAAGGAAAT 2390
 AGCCACCGTC TACAGATGGC TTAGTTAAGT CATCCACAGC CCAAGGGCGG CGGCTATGCC 2450
 TTGTCTGGGG ACCCTGTAGA GTCACTGACC CTGGAGCGGC TCTCCTGAGA GGTGCTGCAG 2510
 GCAAAGTGAG ACTGACACCT CACTGAGGAA GGGAGACATA TTCTTGAGGA ACTTTCCATC 2570
 TGCTTGTATT TTCCATACAC ATCCCCAGCC AGAAGTTAGT GTCCGAAGAA GAGCTTGAAA 2630
 ACTCACTTCA ATGAACAAAG GGATTCTCCA GGATTCCAAA GTTTTGAAGT CATCTTAGCT 2690
 TTCCACAGGA GGGAGAGAAC TAAAAAAGC AACAGTAGCA GGGAAATTGAT CCACTTCTTA 2750
 ATGCTTTCCT CCCTGGCATG ACCATCCTGT CCTTTGTTAT TATCCTGCAT TTTACGTCTT 2810
 TGGAGGAACA GCTCCCTAGT GGCTTCCTCC GTCTGCAATG TCCCTGCAC AGCCACACA 2870
 TGAACCATCC TTCCCATGAT GCCGCTCTTC TGTCATCCCG CTCCTGCTGA AACACCTCCC 2930
 AGGGGCTCCA CCTGTTTCAGG AGCTGAAGCC CATGCTTTCC CACCAGCATG TCACTCCCAG 2990
 ACCACCTCCC TGCCCTGTCC T 3011

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 569 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Met Lys Val Leu Leu Arg Leu Ile Cys Phe Ile Ala Leu Leu Ile Ser
 -20 -15 -10 -5
 Ser Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu
 1 5 10
 Val Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro
 15 20 25
 Asn Glu His Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr
 30 35 40
 Pro Val Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys
 45 50 55 60

Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu
 385 390 395
 Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val
 400 405 410
 Gly Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg
 415 420 425
 Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu
 430 435 440
 Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln
 445 450 455 460
 Asp Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr
 465 470 475
 Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala
 480 485 490
 Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr
 495 500 505
 Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser
 510 515 520
 Pro Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu
 525 530 535 540
 Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly
 545

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1357 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
- (A) ORGANISM: Homo sapiens
 - (G) CELL TYPE: Human B cell lymphoblastoid
 - (H) CELL LINE: CB23
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
- (B) CLONE: pHuIL-1RII75
- (ix) FEATURE:
- (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 154..1350

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 193..1347

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 154..192

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

CTGAAAATA CATTCTGCTA CTCTTAAAA CTAGTGACGC TCATACAAAT CAACAGAAAG	60
AGCTTCTGAA GGAAGACTTT AAAGCTGCTT CTGCCACGTG CTGCTGGGTC TCAGTCCTCC	120
ACTTCCCGTG TCCTCTGGAA GTTGTCAGGA GCA ATG TTG CGC TTG TAC GTG TTG	174
Met Leu Arg Leu Tyr Val Leu	
-13 -10	
GTA ATG GGA GTT TCT GCC TTC ACC CTT CAG CCT GCG GCA CAC ACA GGG	222
Val Met Gly Val Ser Ala Phe Thr Leu Gln Pro Ala Ala His Thr Gly	
-5 1 5 10	
GCT GCC AGA AGC TGC CGG TTT CGT GGG AGG CAT TAC AAG CGG GAG TTC	270
Ala Ala Arg Ser Cys Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe	
15 20 25	
AGG CTG GAA GGG GAG CCT GTA GCC CTG AGG TGC CCC CAG GTG CCC TAC	318
Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr	
30 35 40	
TGG TTG TGG GCC TCT GTC AGC CCC CGC ATC AAC CTG ACA TGG CAT AAA	366
Trp Leu Trp Ala Ser Val Ser Pro Arg Ile Asn Leu Thr Trp His Lys	
45 50 55	
AAT GAC TCT GCT AGG ACG GTC CCA GGA GAA GAA GAG ACA CGG ATG TGG	414
Asn Asp Ser Ala Arg Thr Val Pro Gly Glu Glu Glu Thr Arg Met Trp	
60 65 70	
GCC CAG GAC GGT GCT CTG TGG CTT CTG CCA GCC TTG CAG GAG GAC TCT	462
Ala Gln Asp Gly Ala Leu Trp Leu Leu Pro Ala Leu Gln Glu Asp Ser	
75 80 85 90	
GGC ACC TAC GTC TGC ACT ACT AGA AAT GCT TCT TAC TGT GAC AAA ATG	510
Gly Thr Tyr Val Cys Thr Thr Arg Asn Ala Ser Tyr Cys Asp Lys Met	
95 100 105	
TCC ATT GAG CTC AGA GTT TTT GAG AAT ACA GAT GCT TTC CTG CCG TTC	558
Ser Ile Glu Leu Arg Val Phe Glu Asn Thr Asp Ala Phe Leu Pro Phe	
110 115 120	
ATC TCA TAC CCG CAA ATT TTA ACC TTG TCA ACC TCT GGG GTA TTA GTA	606
Ile Ser Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Leu Ser Thr Ser Gly Val Leu Val	
125 130 135	
TGC CCT GAC CTG AGT GAA TTC ACC CGT GAC AAA ACT GAC GTG AAG ATT	654
Cys Pro Asp Leu Ser Glu Phe Thr Arg Asp Lys Thr Asp Val Lys Ile	
140 145 150	

CAA TGG TAC AAG GAT TCT CTT CTT TTG GAT AAA GAC AAT GAG AAA TTT	702
Gln Trp Tyr Lys Asp Ser Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asn Glu Lys Phe	
155 160 165 170	
CTA AGT GTG AGG GGG ACC ACT CAC TTA CTC GTA CAC GAT GTG GCC CTG	750
Leu Ser Val Arg Gly Thr Thr His Leu Leu Val His Asp Val Ala Leu	
175 180 185	
GAA GAT GCT GGC TAT TAC CGC TGT GTC CTG ACA TTT GCC CAT GAA GGC	798
Glu Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val Leu Thr Phe Ala His Glu Gly	
190 195 200	
CAG CAA TAC AAC ATC ACT AGG AGT ATT GAG CTA CGC ATC AAG AAA AAA	846
Gln Gln Tyr Asn Ile Thr Arg Ser Ile Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys	
205 210 215	
AAA GAA GAG ACC ATT CCT GTG ATC ATT TCC CCC CTC AAG ACC ATA TCA	894
Lys Glu Glu Thr Ile Pro Val Ile Ile Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser	
220 225 230	
GCT TCT CTG GGG TCA AGA CTG ACA ATC CCG TGT AAG GTG TTT CTG GGA	942
Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Thr Ile Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly	
235 240 245 250	
ACC GGC ACA CCC TTA ACC ACC ATG CTG TGG TGG ACG GCC AAT GAC ACC	990
Thr Gly Thr Pro Leu Thr Thr Met Leu Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr	
255 260 265	
CAC ATA GAG AGC GCC TAC CCG GGA GGC CGC GTG ACC GAG GGG CCA CGC	1038
His Ile Glu Ser Ala Tyr Pro Gly Gly Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg	
270 275 280	
CAG GAA TAT TCA GAA AAT AAT GAG AAC TAC ATT GAA GTG CCA TTG ATT	1086
Gln Glu Tyr Ser Glu Asn Asn Glu Asn Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile	
285 290 295	
TTT GAT CCT GTC ACA AGA GAG GAT TTG CAC ATG GAT TTT AAA TGT GTT	1134
Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu His Met Asp Phe Lys Cys Val	
300 305 310	
GTC CAT AAT ACC CTG AGT TTT CAG ACA CTA CGC ACC ACA GTC AAG GAA	1182
Val His Asn Thr Leu Ser Phe Gln Thr Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu	
315 320 325 330	
GCC TCC TCC ACG TTC TCC TGG GGC ATT GTG CTG GCC CCA CTT TCA CTG	1230
Ala Ser Ser Thr Phe Ser Trp Gly Ile Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu	
335 340 345	
GCC TTC TTG GTT TTG GGG GGA ATA TGG ATG CAC AGA CGG TGC AAA CAC	1278
Ala Phe Leu Val Leu Gly Gly Ile Trp Met His Arg Arg Cys Lys His	
350 355 360	
AGA ACT GGA AAA GCA GAT GGT CTG ACT GTG CTA TGG CCT CAT CAT CAA	1326
Arg Thr Gly Lys Ala Asp Gly Leu Thr Val Leu Trp Pro His His Gln	
365 370 375	
GAC TTT CAA TCC TAT CCC AAG TGAATAAAT	1357
Asp Phe Gln Ser Tyr Pro Lys	
380 385	

Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly Thr Gly Thr Pro Leu Thr Thr Met Leu
 245 250 255

Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr His Ile Glu Ser Ala Tyr Pro Gly Gly
 260 265 270 275

Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg Gln Glu Tyr Ser Glu Asn Asn Glu Asn
 280 285 290

Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu
 295 300 305

His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser Phe Gln Thr
 310 315 320

Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser Trp Gly Ile
 325 330 335

Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly Gly Ile Trp
 340 345 350 355

Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp Gly Leu Thr
 360 365 370

Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro Lys
 375 380 385

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 30 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

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

CTGAAGGGAG CACTGGCGAC TAAGGATCCA

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

GATCTGTAAC GTGGTGGCCA TCCCTGGGAA TGCAAGCATG GATGC

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 33 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

AGTCTGCACG TCCACGTCCC CCACCCGGTG AGC

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 12 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

GATCTGTTGA GC

12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 36 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CTGAAACATC AGACGTGGTG TGCAAGCCCT GTTAAA

36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 29 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

GCGTCGACCT AGTGACGCTC ATACAAATC

29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 33 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

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

GCGCGGCCGC TCAGGAGGAG GCTTCCTTGA CTG

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 3..65

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

CT GAA GGG AGC ACT GGC GAC GGT GGC GGT GGA TCC GGC GGT GGC GGC 47
 Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

GGC TCA TTG CCC GCC CAG G 66
 Gly Ser Leu Pro Ala Gln
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Glu Gly Ser Thr Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Pro Ala Gln
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

ACCGAGGGAC CTGAGCG

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 53 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

TGAGCCGCCG CCACCGCCGG ATCCACCGCC ACCAGTGACT GGATATATTA ACT

53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 51 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

GGTGGCGGTG GATCCGGCCG TGGCGGCGGC TCATTGCCCG CCCAGGTGGC A

51

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 18 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

GCTTGCTCAG CGCGCAGT

18



Patenttivaatimukset

1. Eristetty DNA, tunnettu siitä, että se koodaa fuusioproteiinia, jolla on kaava:

5

TNF-R-kytkijäjakso-TNF-R

jossa kytkijäjakso on peptidikytkijäjakso.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, tunnettu siitä, että se koodaa fuusioproteiinia, jossa peptidikytkijäjakso sisältää 5 - 100 aminohappoa, jotka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat glysiini, asparagiini, seriini, treoniini ja alaniini.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, tunnettu siitä, että se koodaa fuusioproteiinia, jossa kumpikin TNF-R on liukoinen TNF-R-polyeptidi.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA, tunnettu siitä, että se koodaa fuusioproteiinia, jossa kumpikin liukoinen TNF-R sisältää aminohapposekvenssin, joka on sekvenssin tunnusnumeron 1 mukaiset aminohapot 1 - x tai -22 - x, jossa x on kokonaisluku 163 - 235.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, tunnettu siitä, että se koodaa fuusioproteiinia, jossa kumpaakin TNF-R:ää koodaa DNA, joka on sekvenssin tunnusnumerolla 1 tai 3 esitettyä nukleotidisekvenssiä sisältävä DNA tai DNA, joka kykenee hybridisoitumaan kohtalaisesti rajoittavissa olosuhteissa sekvenssin tunnusnumeron 1 ja/tai sekvenssin tunnusnumeron 3 mukaiseen nukleotidisekvenssiin, ja TNF-R:ää koodaava DNA koodaa biologisesti aktiivista TNF-R-polyeptidiä.

6. Ilmentämisvektori, tunnettu siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA:ta.

7. Menetelmä sellaisen fuusioproteiinin valmistamiseksi, jolla on kaava

35

TNF-R-polypeptidikytkijäjakso-TNF-R,

tunnettu siitä, että viljellään patenttivaatimuksen 6 mukaisella ilmentämisvektorilla transformoitua isäntäsolua
5 olosuhteissa, jotka edistävät fuusioproteiinin ilmentymistä, ja otetaan fuusioproteiini talteen.

8. Menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, joka sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA:n koodaamaa fuusioproteiinia, tunnettu siitä, että viljellään isäntäsolua, joka sisältää ilmentämisvektorin, joka
10 sisältää mainitun DNA:n olosuhteissa, jotka edistävät fuusioproteiinin ilmentymistä, ja otetaan fuusioproteiini talteen ja sekoitetaan se sopivan laimentimen, lisäaineen ja/tai kantaja-aineen kanssa.

S
E
N
T
ES
E
N
T
E

Patentkrav

1. Isolerat DNA, kännetecknat av att det kodar ett fusionsprotein med formeln:

5

TNF-R-kopplingssekvens-TNF-R

där kopplingsdelen är en peptidkopplingssekvens.

2. DNA enligt patentkrav 1, kännetecknat av att det kodar ett fusionsprotein där kopplingssekvensen innehåller 5 - 100 aminosyror, som valts ur gruppen till vilken hör glycin, asparagin, serin, treonin och alanin.

3. DNA enligt patentkrav 1, kännetecknat av att de kodar ett fusionsprotein där vardera TNF-R är en löslig TNF-R-polypeptid.

4. DNA enligt patentkrav 3, kännetecknat av att det kodar ett fusionsprotein där vardera lösliga TNF-R innehåller en aminosyrasekvens, som utgörs av aminosyror 1 - x eller -22 - x av sekvensen enligt SEQ ID NO 1 där x är ett heltal 163 - 235.

5. DNA enligt patentkrav 1, kännetecknat av att det kodar ett fusionsprotein, där vardera TNF-R kodas av DNA, som innehåller en nukleotidsekvens som visas i SEQ ID NO 1 eller 3, eller DNA som förmår hybridisera med en nukleotidsekvens enligt SEQ ID NO 1 eller 3 under moderat stränga förhållanden, och DNA:t som kodar TNF-R kodar en biologiskt aktiv TNF-R-polypeptid.

6. Expressionsvektor, kännetecknat av att den innehåller DNA enligt patentkrav 1.

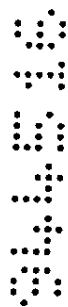
7. Förfarande för framställning av ett fusionsprotein med formeln:

TNF-R-kopplingssekvens-TNF-R

kännetecknat av att man odlar en värdcell som transformerats med en expressionsvektor enligt patentkrav 6 un-

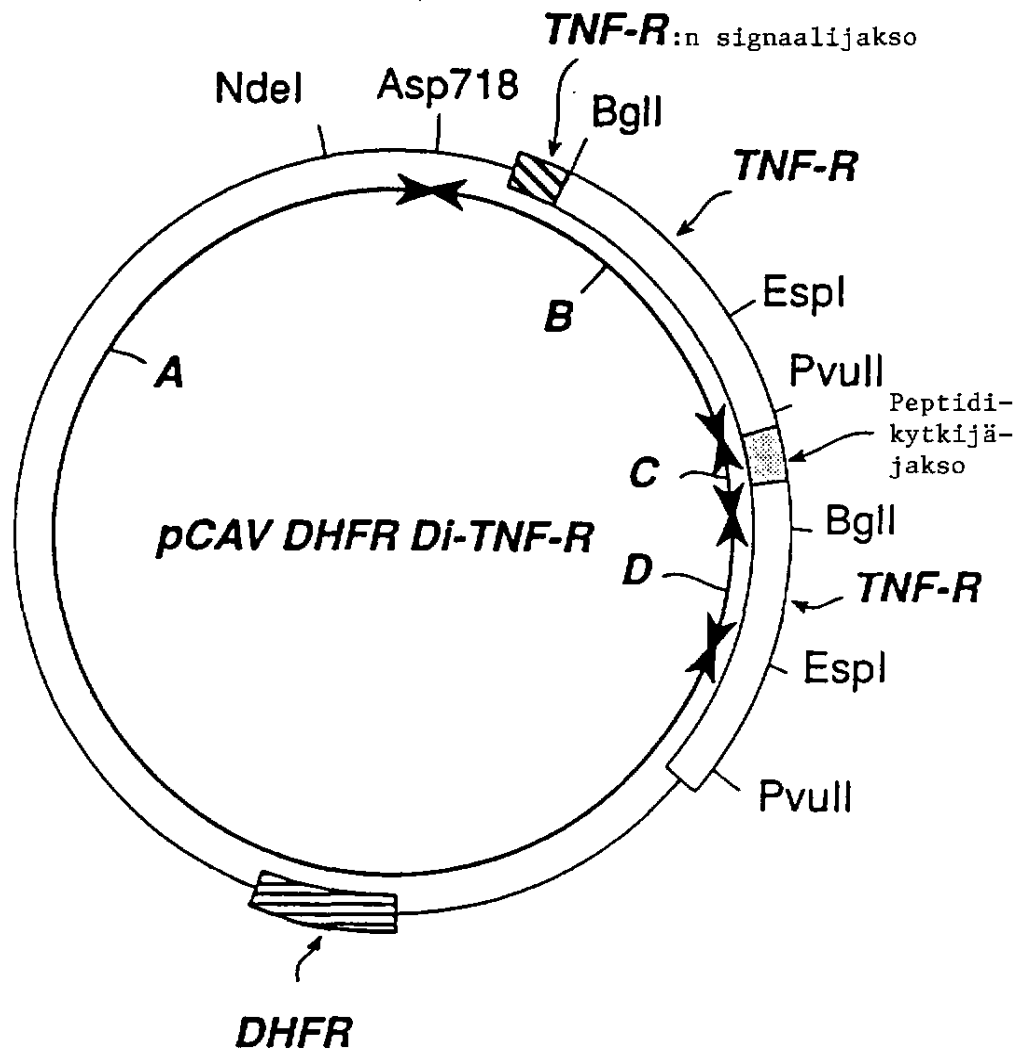
der förhållanden dom främjar expression av fusionsproteinet, och tar tillvara fusionsproteinet.

8. Förfarande för framställning av en farmaceutisk komposition, som innehåller fusionsprotein som kodas av
5 DNA enligt patentkrav 1, kännetecknat av att man odlar en värdcell, som innehåller en expressionsvektor, som innehåller nämnda DNA under förhållanden som främjar expression av fusionsproteinet, och tar fusionsproteinet tillvara och blandar det med ett lämpligt utspädningsmedel,
10 del, en excipient, och/eller en bärare.



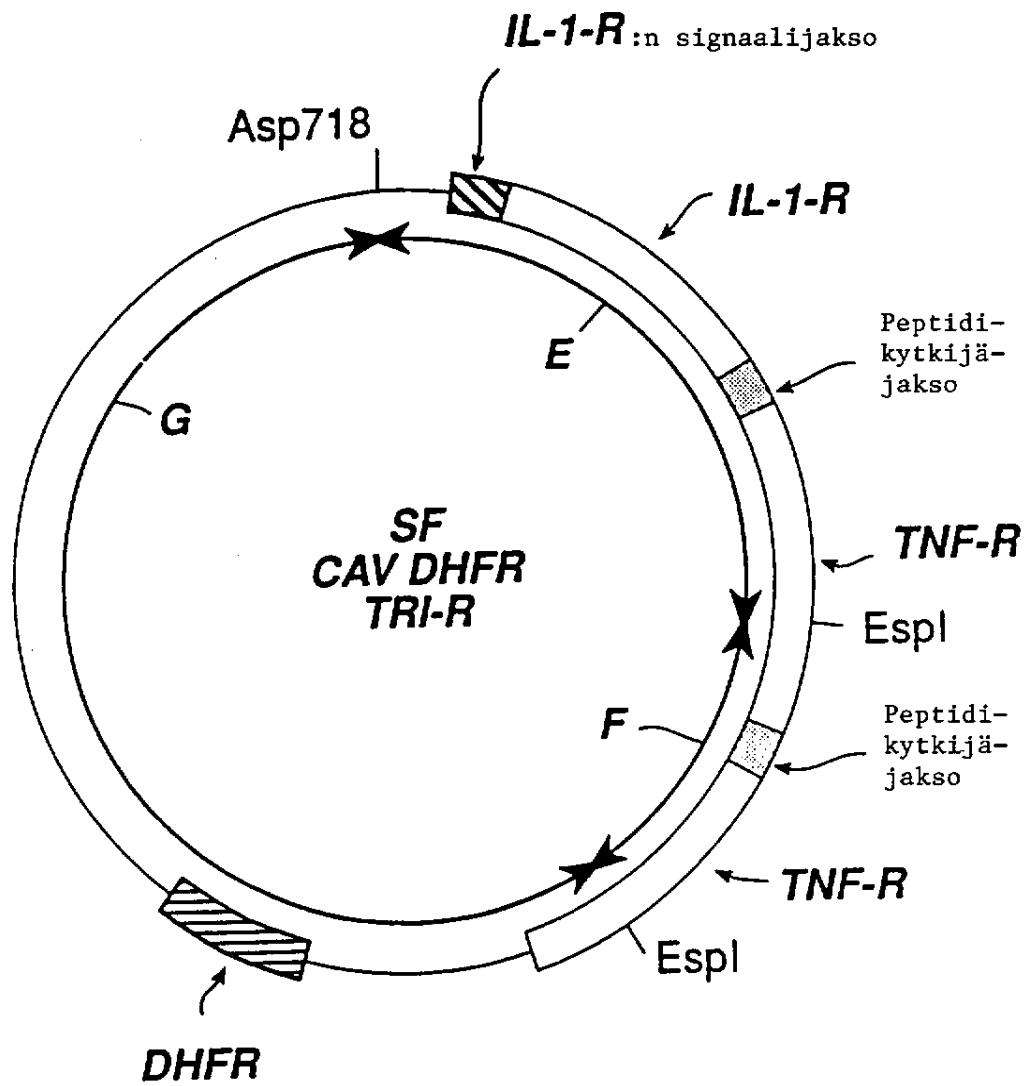
GCGAGGCAGGCAGCCTGGAGAGAGGGCG														25	
CTGGGCTGGAGGGGCGGAGGGGCGGAGGGCAGGGGGCAACCGGACCCCGCCCGCATCC														57	
ATG	GCG	CCC	GTC	GCC	GTC	TGG	GCC	GCG	CTG	GCC	GTC	GGA	CTG	GAG	122
Met	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Trp	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Glu	-8
CTC	TGG	GCT	GCG	GCG	CAC	GCC	TTG	CCC	GCC	CAG	GTG	GCA	TTT	ACA	177
Leu	Trp	Ala	Ala	Ala	His	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln	Val	Ala	Phe	Thr	5
CCC	TAC	GCC	CCG	GAG	CCC	GGG	AGC	ACA	TGC	CGG	CTC	AGA	GAA	TAC	222
Pro	Tyr	Ala	Pro	Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	23
TAT	GAC	CAG	ACA	GCT	CAG	ATG	TGC	TGC	AGC	AAA	TGC	TCG	CCG	GGC	267
Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	Met	Cys	Cys	Ser	Lys	Cys	Ser	Pro	Gly	25
CAA	CAT	GCA	AAA	GTC	TTC	TGT	ACC	AAG	ACC	TCG	GAC	ACC	GTG	TGT	312
Gln	His	Ala	Lys	Val	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Cys	53
GAC	TCC	TGT	GAG	GAC	AGC	ACA	TAC	ACC	CAG	CTC	TGG	AAC	TGG	GTT	357
Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	68
CCC	GAG	TGC	TTG	AGC	TGT	GGC	TCC	CGC	TGT	AGC	TCT	GAC	CAG	GTG	402
Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	83
GAA	ACT	CAA	GCC	TGC	ACT	CGG	GAA	CAG	AAC	CGC	ATC	TGC	ACC	TGC	447
Glu	Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Cys	55
AGG	CCC	GGC	TGG	TAC	TGC	GCG	CTG	AGC	AAG	CAG	GAG	GGG	TGC	CGG	492
Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	113
CTG	TGC	GCG	CCG	CTG	CGC	AAG	TGC	CGC	CCG	GGC	TTC	GGC	GTG	GCC	537
Leu	Cys	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	128
AGA	CCA	GGA	ACT	GAA	ACA	TCA	GAC	GTG	GTG	TGC	AAG	CCC	TGT	GCC	582
Arg	Pro	Gly	Thr	Glu	Thr	Ser	Asp	Val	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Ala	143
CCG	GGG	ACG	TTC	TCC	AAC	ACG	ACT	TCA	TCC	ACG	GAT	ATT	TCC	AGG	627
Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Asp	Ile	Cys	Arg	158
CCC	CAC	CAG	ATC	TGT	AAC	GTG	GTG	GCC	ATC	CCT	GGG	AAT	GCA	AGC	672
Pro	His	Gln	Ile	Cys	Asn	Val	Val	Ala	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Ser	173
ATG	GAT	GCA	GTC	TGC	ACG	TCC	ACG	TCC	CCC	ACC	CGG	AGT	ATG	GCC	717
Met	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Ala	188
CCA	GGG	GCA	GTA	CAC	TTA	CCC	CAG	CCA	GTG	TCC	ACA	GGA	TCC	CAA	762
Pro	Gly	Ala	Val	His	Leu	Pro	Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Arg	Ser	Gln	203
CAC	ACG	CAG	CCA	ACT	CCA	GAA	CCC	AGC	ACT	GCT	CCA	ACC	ACC	TCC	807
His	Thr	Gln	Pro	Thr	Pro	Glu	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	218
TTC	CTG	CTC	CCA	ATG	GGC	CCC	AGC	CCC	CCA	GCT	GAA	GGG	AGC	ACT	852
Phe	Leu	Leu	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Glu	Gly	Ser	Thr	233
GGC	GAC	TTC	GCT	CTT	CCA	GTT	GGA	CTG	ATT	GTG	GGT	GTG	ACA	GCC	897
Gly	Asp	Phe	Ala	Leu	Pro	Val	Gly	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Thr	Ala	248

TTG	GGT	CTA	CTA	ATA	ATA	GGA	GTG	GTG	AAC	TGT	GTC	ATC	ATG	ACC	942
Leu	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Cys	Val	Ile	Met	Thr	263
CAG	GTG	AAA	AAG	AAG	CCC	TTG	TGC	CTG	CAG	AGA	GAA	GCC	AAG	GTG	957
Gln	Val	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Cys	Leu	Gln	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	278
CCT	CAC	TTG	CCT	GCC	GAT	AAG	GCC	CGG	GGT	ACA	CAG	GGC	CCC	GAG	1032
Pro	His	Leu	Pro	Ala	Asp	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Gln	Gly	Pro	Glu	293
CAG	CAG	CAC	CTG	CTG	ATC	ACA	GCG	CCG	AGC	TCC	AGC	AGC	AGC	TCC	1077
Gln	Gln	His	Leu	Leu	Ile	Thr	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	308
CTG	GAG	AGC	TCG	GCC	AGT	GCG	TTG	GAC	AGA	AGG	GCG	CCC	ACT	CGG	1122
Leu	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Pro	Thr	Arg	323
AAC	CAG	CCA	CAG	GCA	CCA	GGC	GTG	GAG	GCC	AGT	GGG	GCC	GGG	GAG	1167
Asn	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Val	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	338
GCC	CGG	GCC	AGC	ACC	GGG	AGC	TCA	GAT	TCT	TCC	CCT	GGT	GGC	CAT	1212
Ala	Arg	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	His	353
GGG	ACC	CAG	GTC	AAT	GTC	ACC	TGC	ATC	GTG	AAC	GTC	TGT	AGC	AGC	1257
Gly	Thr	Gln	Val	Asn	Val	Thr	Cys	Ile	Val	Asn	Val	Cys	Ser	Ser	368
TCT	GAC	CAC	AGC	TCA	CAG	TGC	TCC	TCC	CAA	GCC	AGC	TCC	ACA	ATG	1302
Ser	Asp	His	Ser	Ser	Gln	Cys	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Thr	Met	383
GGA	GAC	ACA	GAT	TCC	AGC	CCC	TCG	GAG	TCC	CCG	AAG	GAC	GAG	CAG	1347
Gly	Asp	Thr	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Glu	Ser	Pro	Lys	Asp	Glu	Gln	398
GTC	CCC	TTC	TCC	AAG	GAG	GAA	TGT	GCC	TTT	CGG	TCA	CAG	CTG	GAG	1392
Val	Pro	Phe	Ser	Lys	Glu	Glu	Cys	Ala	Phe	Arg	Ser	Gln	Leu	Glu	413
ACG	CCA	GAG	ACC	CTG	CTG	GGG	AGC	ACC	GAA	GAG	AAG	CCC	CTG	CCC	1437
Thr	Pro	Glu	Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	428
CTT	GGA	GTG	CCT	GAT	GCT	GGG	ATG	AAG	CCC	AGT					1470
Leu	Gly	Val	Pro	Asp	Ala	Gly	Met	Lys	Pro	Ser					439
TAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGTCGTAGCCAAGGTGGGCTGAGCCCTGGCAGGATGAC															
CCTGCGAAGGGGCCCTGGTCTCCAGGCCCCACCCTAGGACTCTGAGGCTCTTTCT															
GGGCCAAGTTCCTCTAGTGCCCTCCACAGCCGCAGCCTCCCTCTGACCTGCAG															



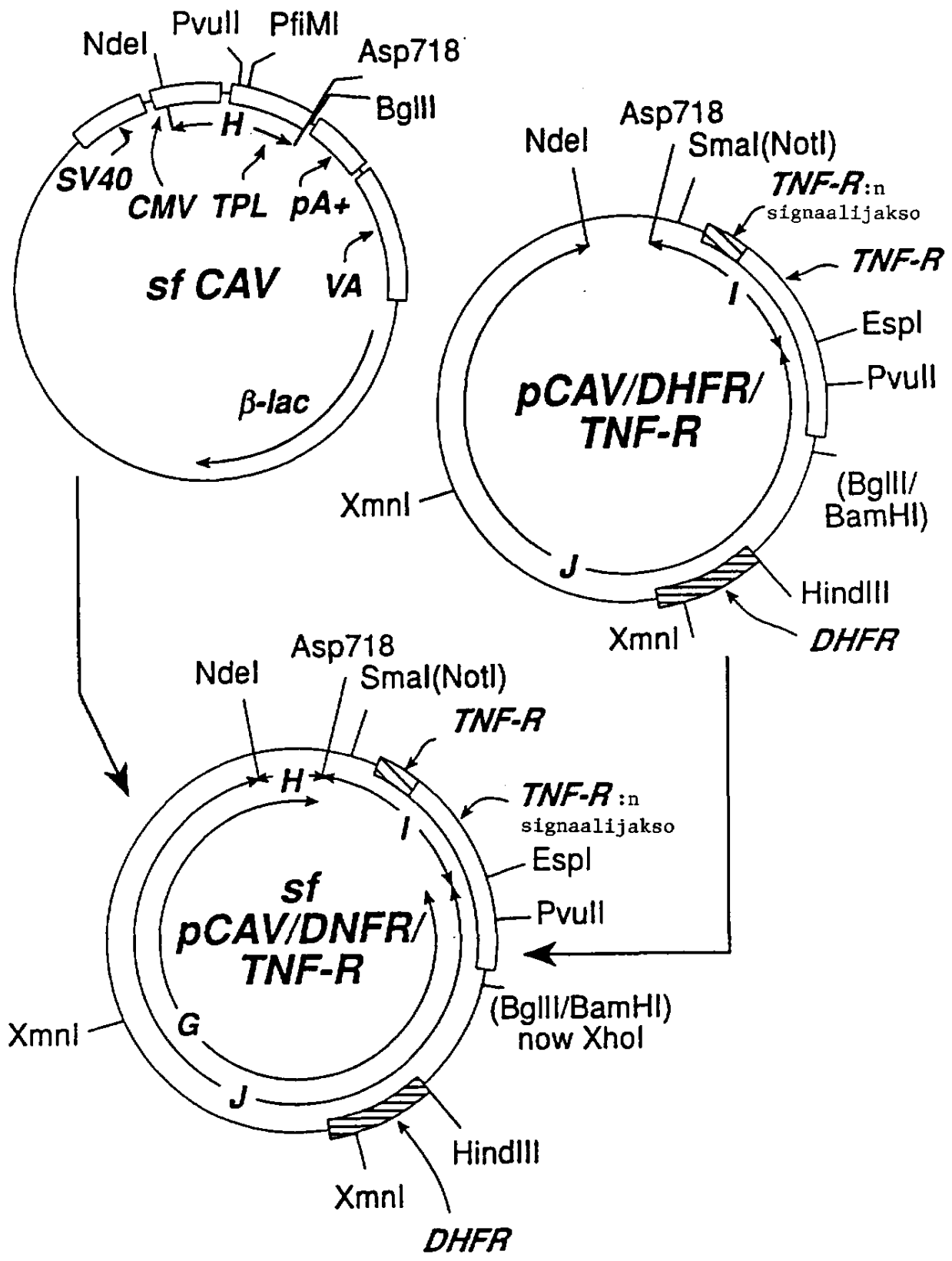
Kuvio 4

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U
V
W
X
Y
Z



Kuvio 5





W
O
R
L
D
S
C
I
E
N
C
E

Kuvio 6