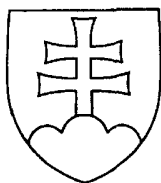


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

287890

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2012.01):

C12N 15/00
C07K 14/00
C12N 9/00
C12N 1/00
C12N 5/00
C07K 16/00
A61K 48/00

- (21) Číslo prihlášky: **50017-2007**
(22) Dátum podania prihlášky: **1. 4. 1997**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **2. 3. 2012**
Vestník ÚPV SR č.: **3/2012**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **117800, 119133**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **2. 4. 1996, 26. 8. 1996**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IL, IL**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **7. 5. 1999**
Vestník ÚPV SR č.: **05/1999**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **15. 2. 2012**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky: **1361-98**
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/IL97/00117**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO97/37016**
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD., Rehovot, IL;**

(72) Pôvodca: **Wallach David, Rehovot, IL;**
Malinin Nikolai, Rehovot, IL;
Boldin Mark, Rehovot, IL;
Kovalenko Andrei, Rehovot, IL;
Mett Igor, Rehovot, IL;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Izolovaný polypeptid, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF-B, DNA sekvencia, ktorá ho kóduje, farmaceutický prostriedok s ich obsahom a ich použitie**

(57) Anotácia:
Vynález sa týka sekvencií DNA kódujúcich proteíny, ktoré sú schopné väzby s TRAF2; ďalej sa týka takto kódovaných proteínov, použitia uvedených proteínov a sekvencií DNA na výrobu liečiva na liečenie alebo prevenciu patologických stavov, spojených s indukciou NF – κB alebo s inou aktivitou, sprostredkovanou TRAF2 alebo inými molekulami, ku ktorým sa uvedené proteíny viažu.

SK 287890 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka sekvencií DNA, kódujúcich proteíny, ktoré sú schopné väzby s TRAF2; ďalej sa týka takto kódovaných proteínov, použitia uvedených proteínov a sekvencií DNA na výrobu liekov na liečenie alebo prevenciu patologických stavov, spojených s indukciou NF- κ B alebo s inou aktivitou, sprostredkovanou TRAF2 alebo inými molekulami, ku ktorým sa uvedené proteíny viažu.

Doterajší stav techniky

Nadčel'ad' receptorov faktorov nekrotizujúcich nádory (tumour necrosis factors, TNF)/rastových nervových faktorov (nerve growth factors, NGF) je definovaná štruktúrnou homológiou extracelulárnych domén ich členov (Bazan, 1993; Beutler a van Huffer, (1994); Smith et al., (1994)). S výnimkou dvoch receptorov, receptora p55 TNF a FAS/APO1, nevykazujú rôzne jedince tejto receptorovej čel'ade zrejmu podobnosť štruktúry ich vnútrobunkových domén. Medzi uvedenými receptormi však jestvuje značná funkčná podobnosť, čo poukazuje na spoločné signálne cesty. Jedným z príkladov tejto podobnosti môže byť schopnosť viacerých receptorov čel'ade TNF/NGF aktivovať transkripčný faktor NF- κ B. Uvedená spoločná schopnosť sa pripísala schopnosti cytoplazmového proteínu, ktorý aktivuje NF- κ B, faktora 2, združeného s receptorom TNF (TNF Receptor Associated Factor 2, TRAF2), viazať sa k štruktúrne rozdielnym intracelulárnym doménam viacerých receptorov z uvedenej čel'ade TNF/NGF. Akým mechanizmom TRAF2 pôsobí a aká je jeho reakcia na rôzne receptory, ku ktorým sa koordinačne viaže, doteraz nie je známe.

TRAF2 je členom nedávno opísanej skupiny proteínov, označenej TRAF, ktorá zahŕňa viaceré proteíny, bližšie určené napríklad ako TRAF 1, TRAF2 (Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. a Goeddel, D., Cell 78, 681 až 682 (1994); zverejnená prihláška WO 95/33 051)), TRAF 3 (Cheng, G. et al. (1995)), a TRAF 6 (pozri Cao et al., (1996a)).

Všetky proteíny, ktoré patria do skupiny TRAF, majú v C-terminálnych doménach vysoký stupeň zhodnosti aminokyselín. Ako je zjrejmé zo schematického znázornenia TRAF2 (obr. 1), uvedená molekula v jej C-terminálnej oblasti obsahuje ring finger zoskupenie a dve XXzinc finger zoskupenia, podobné TFIIIA. C-terminálna polovica molekuly zahŕňa oblasť, ktorá je známa ako „doména TRAF“, obsahujúca potenciálnu leucinovú „zipper“ oblasť medzi aminokyselinami 264 až 358 (označenú N-TRAF) a ďalšiu časť v smere karboxy-zakončenia domény medzi 359. až po 501. aminokyselinou (označenú C-TRAF), ktorá je zodpovedná za väzbu TRAF k receptorom a k ďalším molekulám TRAF za vzniku homo- alebo heterodimérov.

Aktivácia transkripčného faktora NF- κ B je jedným z prejavov signálnej kaskády, iniciovanej niektorými z TNF/NGF receptorov a sprostredkovaných TRAF2. NF- κ B zahŕňa členy skupiny proteínov tvoriacich diméry s homológiou k Rel onkogénu, ktoré, v ich dimérnej forme, pôsobia ako transkripčné faktory. Tieto faktory sa vyskytujú všade a zúčastňujú sa na regulácii exprese mnohých génov. Hoci boli pôvodne označené ako faktor, ktorý je konštitutívne prítomný v B-bunkách v štádiu exprese Igk ľahkého reťazca, NF- κ B je známy najmä pre jeho účinok ako indukovateľný transkripčný aktivátor. Vo väčšine známych prípadov sa NF- κ B správa ako primárny faktor, menovite indukcia jeho aktivity prebieha aktiváciou molekúl, prítomných už v neaktívnej forme bunky, skôr ako by bol *de-novo* syntetizovaný, čo sa naopak vzťahuje na indukovateľné transkripčné faktory, ktoré napádajú NF- κ B gén XX turn-on the NF- κ B. Účinok NF- κ B je vysoko pleiotrópny. Väčšina z týchto početných účinkov má spoločnú vlastnosť v tom, že sú rýchlo indukovateľné ako reakcia na extracelulárny podnet. Väčšina NF- κ B aktivačných činidiel sú induktory imunitnej obrany vrátane zložiek vírusov a baktérií, cytokínov, ktoré regulujú imunitnú reakciu, UV svetla a ďalších. Podľa uvedeného mnohé z génov regulovaných NF- κ B prispievajú k imunitnej obrane (pozri prehľadné práce Blank et al. (1992); Grilli et al. (1993); Baeuerle a Henkel (1994)).

Jedným z hlavných znakov NF- κ B -regulácie je, že tento faktor môže jestvovať v cytoplazmovej ne-DNA väzbovej forme, ktorá môže byť indukovaná na translokáciu k jadru, viazať DNA a aktivovať transkripciu. Uvedená dvojité forma NF- κ B -proteínov je regulovaná I- κ B, čo je skupina proteínov, obsahujúcich repetície domény, ktoré boli pôvodne rozlíšené v erytrocytovom proteíne ankryríne (Gilmore a Morin (1993)). Uvedený NF- κ B dimér v nestimulovanej forme sa nachádza združený s I- κ B molekulou, ktorá je na diméri uložená v cytoplazmovej polohe a zabraňuje jeho reakcii s NF- κ B-väzbovou DNA-sekvenciou a aktivácii transkripcie. Disociácia I- κ B z NF- κ B diméru predstavuje kritický krok aktivácie mnohých z indukčných činidiel (DiDonato et al. (1995)). Poznatky o mechanizme, ktorý umožňuje túto reguláciu sú stále obmedzené. Rovnako je málo poznatkov na pochopenie cesty, ktorou je určená špecifickosť bunky z hľadiska reakcií na rôzne NF- κ B-indukčné činidlá.

Jedným z najviac účinných indukčných činidiel NF- κ B je cytokínový nádor nekrotizujúci faktor (Tumour Necrosis Factor, TNF). Jestvujú dva rôzne TNF receptory, receptor p55 a receptor p75. Úroveň ich exprese sa mení nezávisle od druhu buniek (Vandenabeele et al., (1995)). Receptor p75 reaguje prednostne na bunkou

viazanú formu TNF (TNF je exprimovaný aj ako beta-transmembránový proteín, aj ako rozpustný proteín), zatiaľ čo receptor p55 reaguje rovnako účinne na rozpustné molekuly TNF (Grell et al.(1995)). Vnútro-
bunkové domény uvedených dvoch receptorov nemajú štruktúrnú podobnosť a viažu rozdielne cytoplazmatické
proteíny. Jednako však, najmenej časť účinku TNF vrátane cytotodálneho účinku TNF a indukcie NF- κ B
5 môže byť spôsobená obidvoma uvedenými druhmi receptorov. Tento jav je bunkovo špecifický. Uvedený re-
ceptor p55 je schopný indukovať cytotodálny efekt alebo aktiváciu NF- κ B vo všetkých bunkách, ktoré tieto
účinky prejavujú ako reakciu na TNF. Receptor p75-R môže mať uvedené účinky iba pri niektorých bun-
kách. Iné bunky, hoci exprimujú vysoké hladiny p75-R, vykazujú indukciu uvedených účinkov iba ako odo-
zvu na stimuláciu receptora p55 (Vandenabeele et al. (1995)). Popri TNF receptorov sú aj iné receptory zo
10 skupiny receptorov TNF / NGF, ktoré sú schopné tiež indukovať aktiváciu NF- κ B: CD30 (McDonald et al.
(1995)), CD40 (Berberich et al. (1994)); Lalmanach-Girard et al., (1993)), lymfotoxínový beta-receptor a pri
niektorých typoch buniek FAS/APO1 (Rensing-Ehl et al. (1995)). Receptor IL-1 typu I tiež účinne spúšťa ak-
tiváciu NF-
- κ B, má väčšinu účinkov obdobných receptorom TNF napriek tomu, že s nimi nemá nijakú štruktúrnú po-
15 dobnosť.

Aktivácia NF- κ B po spustení rôznymi receptormi je dôsledkom vyvolanej fosforylácie I- κ B molekúl,
združenými s NF- κ B. Fosforylácia vedie k degradácii I- κ B, čo najvhodnejšie nastáva v proteasome XX. Pod-
stata kinázy, ktorá fosforyluje I- κ B a mechanizmus aktivácie po spustení receptorom nie sú doteraz známe. V
posledných dvoch rokoch sa však získali niektoré poznatky o identite troch receptorovo združených proteí-
20 nov, o ktorých sa predpokladá, že sa zúčastňujú na iniciácii fosforylácie (pozri grafické znázornenie na obr
2a a 6). Usudzuje sa, že ústrednú úlohu pri aktivácii rôznymi receptormi zo skupiny TNF / NGF má proteín,
nazvaný TRAF2, pôvodne klonovaný D. Goddelom a jeho kolegami (Rothe et al. (1994)). Ak je uvedený
proteín exprimovaný vo vysokých úrovniach koncentrácií, sám môže spustiť aktiváciu NF- κ B, viazať sa k
aktivovanému p75 TNF-R (Rothe et al. (1994)), lymfotoxínovému beta receptoru (Mosialos et al. (1995)),
25 CD40 (Rothe et al. (1995a)) a CD30 (nepublikované údaje) a nimi sprostredkovať indukciu NF- κ B. TRAF2
sa neviaže k p55 TNF receptoru ani k FAS/APO1, ale môže sa viazať k proteínu združenom s receptorom
p55; tento proteín sa označuje TRADD a má schopnosť viazať sa k proteínu združenému s FAS/APO1, ktorý
sa označuje MORT1 (alebo FADD - pozri Boldin et al. (1995b) a (1996)). Iný proteín, ktorý vstupuje do in-
terakcie s receptormi, označovaný RIP (pozri Stanger et al.(1995)), je schopný vstúpiť do interakcie tiež s
30 TRAF2, ako aj s FAS/APO1, TRADD, p55 TNF receptorom a MORT-1. Kým RIP je spojený s indukciou
bunkovej cytotoxickosti (bunková smrť), potom jeho schopnosť vstupovať do interakcie s TRAF2 implikuje
tiež jeho zapojenie do aktivácie NF- κ B a môže navyše slúžiť tiež na zvýšenie interakcie medzi FAS/APO1,
MORT-1, p55 TNF receptorom a TRADD s TRAF2 reakčnou cestou, vedúcou k aktivácii NF- κ B. Uvedené
súvislosti zjavne umožňujú spúšťanie NF- κ B aktivácie účinkom p55 TNF receptora a FAS/APO1 (Hsu et al.
35 (1995); Boldin et al.(1995); Chinnalyan et al. (1995); Varfolomeev et al. (1996); Hsu et al. (1996)). Spúšťa-
nie aktivácie NF- κ B receptorom IL-1 nastáva nezávisle od TRAF2 a môže zahŕňať kinázu, nedávno klonov-
vanú proteínom združeným s IL-1 receptorom, označovanú IRAK (Croston et al., (1995)).

Akým mechanizmom pôsobí TRAF2 nie je doteraz jasné. Niektoré cytoplazmatické molekuly, ktoré sa
viažu s TRAF2 už boli identifikované (Rothe et al., (1994); Rothe et al., (1995b)). Informácie o týchto mole-
40 kulách však neposkytujú nijaké náznaky o dráhe, ktorou TRAF2 začína fosforyláciu I- κ B, pretože samotný
TRAF2 nevykazuje nijakú enzymatickú aktivitu. Doteraz chýbajú informácie tiež o mechanizme, ktorý určuje
bunkovo špecifický obraz aktivácie TRAF2 rôznymi receptormi tak, ako bol pozorovaný pri indukcii NF-
 κ B uvedenými dvoma TNF receptormi.

Okrem už uvedeného o rôznych TRAF proteínoch treba navyše poznamenať, že TRAF2 sa viaže s p55
45 (CD120a) a p75(CD120b) TNF receptormi, ako aj s viacerými receptormi zo skupiny TNF/NGF receptorov,
buď priamo, alebo nepriamo cez ďalšie adaptorové proteíny, ako už bolo uvedené, napríklad ako FAS/APO1
receptor a adaptorové proteíny MORT-1, TRADD a RIP. Pri aktivácii NF- κ B je rozhodujúci TRAF2 sám o
sebe (pozri Wallach (1996)). Aktiváciu NF- κ B niektorými receptormi zo skupiny receptorov TNF/NGF však
inhibuje TRAF3 (pozri Rothe et al. (1995a)), zatiaľ čo na indukciu NF- κ B receptorom IL-1 sa vyžaduje
50 TRAF6 (pozri Cao et al. (1996a)).

V súvislosti s aktiváciou NF- κ B a jej dôležitosťou so zachovaním životaschopnosti buniek, neboli doteraz
celkom jasne vyriešené rôzne intracelulárne reakčné cesty tejto aktivácie, napríklad to, ako sa rôzne TRAF
proteíny priamo alebo nepriamo zúčastňujú na týchto pochodoch.

Ďalej, ako je teraz známe pri niektorých členoch receptorovej skupiny TNF/NGF a pre s nimi združené
55 intracelulárne signálne dráhy vrátane rôznych adaptorov, mediátorových/modulátorových proteínov (pozri
prehľady a odkazy napríklad v spoluvlastnených závislých prihláškach izraelských patentov číslo 114 615,
114 986, 115 319, 116 588), môže napríklad ligand TNF a FAS/APO1 mať podporný alebo aj ničivý účinok
na bunky. TNF napríklad prispieva k obrane organizmu proti nádorom a infekčným látkam a prispieva na zo-
tavenie z úrazov indukciou ničenia nádorových buniek a vírusom nakazených buniek, zvyšuje protibakteriál-

nu aktivitu granulocytov. V týchto prípadoch je uvedené, s TNF indukované, ničenie buniek želateľné. Nadbytok TNF však môže byť ničivý a ako je o samotnom TNF známe, má významnú patogénnu úlohu v značnom počte ochorení, ako sú septický šok, anorexia, reumatické choroby, zápaly a reakcie štepov s príjemcom. V takých prípadoch je s TNF indukované ničenie buniek nežiaduce. Uvedený FAS/APO1 ligand má napríklad tiež želateľné, ale aj nežiaduce účinky. Tento ligand indukuje cez jeho receptory ničenie autoreaktívnych T buniek v priebehu dozrievania T buniek, to znamená ničenie T buniek, ktoré rozpoznávajú vlastné antigény v priebehu ich vývoja a tak chránia pred autoimúnnymi ochoreniami. Ďalej, rôzne malignančné bunky a HIV- nakazené bunky nesú na svojom povrchu FAS/APO1 receptor a môžu tak byť zničené aktiváciou tohto receptora jeho ligandom alebo protilátkou k nemu špecifickou, a tak je týmto receptorom sprostredkovaná aktivácia intracelulárnej cesty odumierania buniek (apoptosis). Receptor FAS/APO1 však môže mať aj ničivý účinok, napríklad neovládané ničenie tkaniva, ktoré sa pozoruje pri niektorých ochoreniach ako je akútna hepatitída, čo je spojené s deštrukciou pečenevých buniek.

Z hľadiska uvedených poznatkov, najmä toho, že receptory skupiny TNF / NGF môžu indukovať reakčnú dráhu ničenia buniek na jednej strane a na druhej strane môžu indukovať cestu prežitia buniek (cez indukciu NF- κ B), zrejme jestvuje jemná rovnováha, intracelulárne medzi týmito dvoma protichodnými reakčnými dráhami. Ak je napríklad želateľné dosiahnuť čo najväčšiu deštrukciu rakovinových buniek alebo inak infikovaných alebo chorých buniek, bude cieľom mať ligand TNF a/alebo FAS/APO1 indukujúci iba reakčnú cestu ničenia buniek bez indukcie NF- κ B. Obrátene, ak je želateľné chrániť bunky, ako je to napríklad pri zápalových ochoreniach, pri reakciách štepu s hostiteľom, alebo pri akútnej hepatitide, je cieľom zamedziť indukcii ničenia buniek TNF a/alebo FAS/APO1 ligandom a miesto toho podporiť indukciu NF- κ B. Podobne, v určitých patologických podmienkach bude želateľné blokovať intracelulárne signálne cesty, sprostredkované receptormi p75 a IL-1, zatiaľ čo v iných podmienkach bude cieľom tieto intracelulárne reakčné cesty podporiť.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je izolovaný polypeptid, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B, ktorý obsahuje:

- a) aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 5;
- b) aminokyselinovú sekvenciu fragmentu a), ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B;
- c) aminokyselinovú sekvenciu analógu a) alebo b), ktorý nemá viac ako desať zmien v aminokyselinovej sekvencii a) alebo b), pričom každá takáto zmena je substitúciou, deléciou alebo inzerciou aminokyseliny, pričom tento analóg sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B.

Zároveň je súčasťou podstaty vynálezu aj izolovaná DNA sekvencia kódujúca skôr uvedený polypeptid, ktorá je vybraná zo skupiny obsahujúcej:

- (i) cDNA sekvenciu obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:4;
- (ii) fragment sekvencie (i), ktorý kóduje polypeptid viažuci sa na TRAF2 a modulujúci aktivitu NF- κ B.

Nové proteíny podľa tohto vynálezu sú tiež nepriame modulátory/mediátory intracelulárnej biologickej aktivity rôznych ďalších proteínov, ktoré sú schopné vstupovať do interakcie s receptorom TRAF proteínov priamo alebo nepriamo (napríklad s FAS/APO1 receptorom, p55 TNF receptorom, p75 TNF receptorom, IL-1 receptorom a s nimi združenými proteínmi, ako je napríklad MORT-1, TRADD, RIP).

Vynález ďalej zahŕňa antagonisty (napríklad protilátky, peptidy, organické zlúčeniny, alebo aj niektoré izoformy) k už uvedeným novým proteínom, viažucich sa k TRAF vrátane izoformiem, analógov, fragmentov a ich derivátov, ktoré sa môžu použiť na inhibíciu signálneho procesu, alebo, bližšie, na inhibíciu aktivácie NF- κ B a jeho zapojenia v životných procesoch bunky, ak sa také ovplyvnenie vyžaduje. Podobne, keď sa proteíny podľa tohto vynálezu, viažuce sa k TRAF, alebo proteín TRAF, ku ktorému sa viažu (napríklad TRAF3), sú samy inhibítormi aktivácie NF- κ B, potom je požiadavka mať antagonisty k týmto TRAF-väzbovým proteínom, aby aktivovali signálny proces, bližšie, aby blokovali inhibíciu aktivácie NF- κ B a tým sa zvýšila aktivácia NF- κ B, ak sa taká aktivácia vyžaduje.

Vynález ďalej zahŕňa použitie uvedených nových TRAF-väzbových proteínov, izoformiem, analógov, fragmentov a ich derivátov, na izoláciu a charakterizáciu ďalších proteínov alebo faktorov, ktoré môžu byť zapojené do regulácie TRAF-proteínovej aktivity a/alebo do uvedenej receptorovej aktivity, napríklad ďalšie proteíny, ktoré môžu viazať TRAF proteíny a ovplyvňovať ich aktivitu, a/alebo na izoláciu a identifikáciu ďalších receptorov, alebo ďalších bunkových proteínov v smere alebo proti smeru v signálnom procesoch, ku ktorým sa tieto nové proteíny, analógy, fragmenty a ich deriváty viažu, a preto sú aj zapojené do ich funkcií.

Vynález ďalej zahŕňa inhibítory, ktoré môžu byť vložené do buniek tak, aby viazali alebo vstupovali do interakcie s novými TRAF-väzbovými proteínmi a ich možnými izoformami; uvedené inhibítory môžu spôsobovať inhibíciu aktivity spojenej s TRAF-proteínmi, napríklad v aktivácii NF- κ B a preto, ak sa to vyžaduje

je, môžu inhibovať aktiváciu NF- κ B; alebo môžu pôsobiť inhibične na inhibičné aktivity spojené s TRAF (napríklad TRAF3) pri aktivácii NF- κ B a preto, ak sa vyžaduje, môžu zvyšovať NF- κ B aktiváciu.

Vynález ďalej zahŕňa použitie uvedených nových TRAF väzbových proteínov, izoformiem a analógov, fragmentov a ich derivátov ako antigény na prípravu ich polyklonových a/alebo monoklonových protilátok.

5 Protilátky môžu byť naopak použité, napríklad, na čistenie nových proteínov z rôznych zdrojov, ako sú bunkové extrakty alebo transformované bunkové línie.

10 Ďalej, uvedené protilátky sa môžu použiť na diagnostické účely, napríklad na identifikáciu porúch súvisiacich s abnormálnym priebehom bunkových funkcií, sprostredkovaných priamo proteínmi TRAF alebo sprostredkovanými p55 TNF receptorom, FAS/APO1 receptorom alebo inými príbuznými receptormi a s nimi združenými bunkovými proteínmi (napríklad MORT-1, TRADD, RIP), ktoré pôsobia priamo alebo nepriamo na moduláciu/mediáciu intracelulárnych dejov cez interakcie s TRAF proteínmi.

Vynález ďalej zahŕňa farmaceutické kompozície, obsahujúce uvedené nové proteíny, izoformy, alebo analógy, fragmenty alebo ich deriváty, ako aj farmaceutické kompozície uvedených protilátok alebo iných antagonistov.

15 Podľa tohto vynálezu sa izolovalo viacero nových TRAF-väzbových proteínov, najmä TRAF2-väzbových proteínov. Uvedené TRAF2 väzbové proteíny majú vysokú špecifickosť väzby k TRAF2 (pozri ďalej uvedené príklady), a preto sú modulátormi alebo mediátormi TRAF2 intracelulárnej aktivity. TRAF2 je zapojený do modulácie alebo mediácie najmenej jednej intracelulárnej signálnej dráhy, ktorá je obdobná dráham na prežitie buniek alebo dráham ich životaschopnosti, v ktorých je TRAF2 v priamom spojení s aktiváciou NF- κ B, ktorý má kľúčovú úlohu v živote bunky. Jeden z nových proteínov, označený NIK („NF- κ B inducing kinase“, NIK, „NF- κ B indukujúci kináza“) sa skutočne viaže k TRAF2 a stimuluje aktivitu NF- κ B. NIK je kináza, ktorá sa vyznačuje sekvenčnou podobnosťou s niektorými MAPKK kinázami (pozri v ďalšom texte). Tým, že TRAF2 je schopný interakcie priamo alebo nepriamo s uvedeným p55 TNF receptorom, p75 TNF receptorom, FAS/APO1 receptormi a s proteínmi MORT-1, TRADD a RIP, ktoré sú s nimi združené, je tiež mediátorom (sprostredkovateľom) alebo modulátorom indukcie NF- κ B alebo aktivácie aktivity, vlastnej týmto receptorom. TRAF2 je preto modulátor/mediátor dráhy prežitia bunky (ako protiklad dráhy smrti bunky), sprostredkovanej týmito receptormi a s nimi združenými proteínmi a rozsah interakcie medzi týmito receptormi a/alebo proteínmi s TRAF2 je dôležitým faktorom v celkovej aktivite týchto receptorov (už aktivovaných ich ligandmi) najmä vtedy, ak bunky majú žiť alebo zahynúť. Podľa uvedeného majú proteíny podľa 20 tohto vynálezu, napríklad NIK, kľúčovú úlohu v uvedenej interakcii medzi TRAF2 a ďalšími proteínmi/receptormi, s ktorými TRAF2 vstupuje do interakcie; proteíny, ako je NIK, špecifickou väzbou k TRAF2 bude modulovať jeho aktivitu a/alebo aktivita proteínov bude modulovaná cez interakciu s TRAF2.

35 Uvedené TRAF-väzbové proteíny, ako sú napríklad TRAF-väzbové proteíny vrátane NIK, sa izolovali a klonovali s použitím dvojhybridného systému, čiastočne a celkom sekvenované; ďalej sa charakterizovali a ako sa v ďalšom ukázalo, sú to vysoko špecifické TRAF2-väzbové proteíny, a preto aj špecifické TRAF2 modulátory/mediátory.

40 V tomto texte používaný výraz TRAF proteínová aktivita, napríklad aktivita TRAF2, zahŕňa jeho aktivitu pri modulácii/mediácii na dráhe prežitia bunky, a najmä čo sa týka indukcie/aktivácie NF- κ B. Podobne sa v tomto texte používa výraz aktivita TRAF-väzbového proteínu, najmä TRAF2-väzbového proteínu vo význame, ktorý zahŕňa moduláciu/mediáciu aktivity TRAF, najmä aktivity TRAF2 v dôsledku špecifickej väzby k TRAF, najmä TRAF2 proteínom; táto modulácia/mediácia vrátane modulácie/mediácie životných dráh bunky (cell survival pathways) a najmä tých, ktoré sú vo vzťahu s NF- κ B aktiváciou/indukciou, v ktorej sú TRAF proteíny, najmä TRAF2 proteín zapojené priamo alebo nepriamo a tak sa TRAF-, alebo TRAF2 väzbové proteíny môžu považovať ako nepriame modulátory/mediátory všetkých uvedených proteínov a možno 45 aj celého radu ďalších, ktoré sú v spojení s prežívaním bunky, najmä s aktiváciou/indukciou NF- κ B a s ktorými sa viaže TRAF2 (alebo iné TRAF proteíny), alebo s ktorými TRAF2 (alebo iné TRAF proteíny) vstupujú do interakcie priamym alebo nepriamym spôsobom.

Jedným uskutočnením vynálezu je teda izolovaný polypeptid, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B, a obsahuje:

- 50 a) aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:2;
 b) aminokyselinovú sekvenciu fragmentu a), ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B;
 c) aminokyselinovú sekvenciu analógu a) alebo b), ktorý nemá viac ako desať zmien v aminokyselinovej sekvencii a) alebo b), pričom každá takáto zmena je substitúciou, deléciou alebo inzerciou aminokyseliny, pričom tento analóg sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B; alebo
 55 d) derivát a), b) alebo c), ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B.

Výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka polypeptidu s aminokyselinovou sekvenciou SEQ ID NO:2.

Predmetom predloženého vynálezu je aj DNA sekvencia kódujúca ktorýkoľvek z definovaných polypeptidov.

Táto izolovaná DNA sekvencia kódujúca polypeptid, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B, je vybraná zo skupiny obsahujúcej:

- (i) cDNA sekvenciu obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:1;
- (ii) fragment sekvencie (i), ktorý kóduje polypeptid viažuci sa na TRAF2 a modulujúci aktivitu NF- κ B;
- (iii) DNA sekvenciu schopnú hybridizovať so sekvenciou podľa (i) až (ii) v stredne prísnych podmienkach a kódujúcu polypeptid viažuci sa na TRAF2 a modulujúci aktivitu NF- κ B; a
- (iv) akúkoľvek DNA sekvenciu líšiacu sa od sekvencií definovaných v (i) až (iii), ktorá kóduje definovaný polypeptid.

Jedno výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka izolovanej DNA sekvencie, ktorá obsahuje nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:1.

Predmetom predloženého vynálezu je aj vektor obsahujúci definovanú DNA sekvenciu. A to vektor, ktorý je schopný exprimovať sa v eukaryotickej hostiteľskej bunke alebo vektor, ktorý je schopný exprimovať sa v prokaryotickej hostiteľskej bunke.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu sú eukaryotické alebo prokaryotické hostiteľské bunky transformované definovaným vektorom.

Predložený vynález sa týka aj spôsobu produkcie TRAF2-viažuceho proteínu, jeho izoformy, fragmentu, analógu alebo derivátu, ktorý zahŕňa pestovanie transformovanej hostiteľskej bunky v podmienkach vhodných na expresiu tohto proteínu, jeho izoformy, fragmentu, analógu alebo derivátu, účinnú post-translačnú modifikáciu, ak je to nevyhnutné na získanie tohto proteínu, jeho izoformy, fragmentu, analógu alebo derivátu, izoláciu exprimovaného proteínu, jeho izoformy, fragmentu, analógu alebo derivátu.

Vynález ďalej zahŕňa protilátky alebo ich aktívne fragmenty alebo deriváty špecifické pre definovaný polypeptid.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu je použitie definovaného polypeptidu na moduláciu alebo sprostredkovanie aktivity NF- κ B alebo akejkoľvek inej vnútrobunkovej signálnej aktivity modulovanej alebo sprostredkovanej s TRAF2, v bunkách, pričom sa do buniek zavádza jeden alebo viacero týchto polypeptidov vo forme vhodnej na vnútrobunkové zavádzanie, alebo sa do buniek zavádza DNA sekvencia kódujúca jeden alebo viacero takýchto polypeptidov, vo forme vhodného vektora nesúceho túto sekvenciu, ktorý je schopný účinne začleniť túto sekvenciu do buniek spôsobom, pri ktorom sa v bunkách sekvencia exprimuje.

V jednom uskutočnení predloženého vynálezu sa bunka transfekuje s rekombinantným živočíšnym vírusovým vektorom zahŕňajúc nasledujúce kroky:

- a) konštrukciu rekombinantného živočíšneho vírusového vektora nesúceho sekvenciu, ktorá kóduje vírusový povrchový proteín – ligand, schopný viazať sa na špecifický bunkový povrchový receptor na povrchu buniek, ktoré sa majú transfekovať, a druhú sekvenciu kódujúcu proteín vybraný z proteínov, izoformiem, analógov, fragmentov a derivátov, ktoré, keď sa exprimujú v týchto bunkách, sú schopné modulovať/sprostredkovať aktivitu NF- κ B alebo akúkoľvek inú vnútrobunkovú signálnu aktivitu modulovanú/sprostredkovanú prostredníctvom TRAF2 alebo ostatnými uvedenými molekulami; a
- b) infikovanie buniek s vektorom podľa a).

Predmetom predloženého vynálezu je aj použitie definovanej protilátky na modulovanie účinku modulovaného/sprostredkovaného prostredníctvom TRAF2 na bunky, pričom na bunky sa aplikuje vhodný prostriedok obsahujúci tieto protilátky, ich aktívne fragmenty alebo deriváty, pričom keď je TRAF2-väzobný proteín týchto buniek alebo jeho časti exponovaný na extracelulárnom povrchu, prostriedok je formulovaný na extracelulárnu aplikáciu, a keď sú TRAF2-väzobné proteíny intracelulárne, prostriedok je formulovaný na intracelulárnu aplikáciu.

Vynález zahŕňa aj použitie oligonukleotidovej sekvencie kódujúcej antisense sekvenciu najmenej časti DNA sekvencie, kódujúcej definovaný polypeptid, na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, pričom sa na bunky pôsobí touto oligonukleotidovou sekvenciou, a táto sekvencia je schopná blokovat' expresiu TRAF2-väzobného proteínu.

V jednom výhodnom uskutočnení uvedeného použitia sa oligonukleotidová sekvencia zavádza do buniek prostredníctvom rekombinantného živočíšneho vírusového vektora nesúceho sekvenciu kódujúcu vírusový povrchový proteín – ligand, ktorý je schopný viazať sa na špecifický bunkový povrchový receptor na povrchu buniek, na ktoré sa má pôsobiť, a druhú sekvenciu kódujúcu uvedenú oligonukleotidovú sekvenciu.

Ďalší predmet vynálezu sa týka použitia definovaného polypeptidu na modulovanie TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, pričom sa aplikuje ribozýmový postup, pri ktorom sa vektor kódujúci ribozýmovú sekvenciu schopnú interagovať s bunkovou mRNA sekvenciou kódujúcou uvedený polypeptid, zavádza do buniek vo forme, ktorá umožňuje expresiu ribozýmovej sekvencie v bunkách, a pri exprimovaní ribozýmovej sekvencie v bunkách, táto interaguje s uvedenou bunkovou mRNA sekvenciou a štiepi túto mRNA sekvenciu, čím inhibuje expresiu TRAF2-väzobného proteínu v bunkách.

Ďalší predmet vynálezu zahŕňa spôsob izolácie a identifikácie definovaného polypeptidu schopného priamo sa viazať na TRAF2, pričom pri tomto spôsobe sa aplikuje kvasinkový dvojhybridný postup, pri ktorom je sekvencia kódujúca TRAF2 nesená jedným hybridným vektorom, a sekvencia z cDNA knižnice alebo

z genomickej DNA knižnice je nesená druhým hybridným vektorom, pričom tieto vektory sa potom použijú na transformáciu kvasinkových hostiteľských buniek a pozitívne transformované bunky sa izolujú, následne sa extrahuje druhý hybridný vektor na získanie sekvencie kódujúcej proteín, ktorý sa viaže na TRAF2.

5 Predložený vynález ďalej zahŕňa farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, ktorý obsahuje ako účinnú zložku najmenej jeden z definovaných polypeptidov.

10 Predložený vynález ďalej zahŕňa farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, ktorý obsahuje ako účinnú zložku rekombinantný živočíšny vektor kódujúci proteín, ktorý je schopný viazať sa na bunkový povrchový receptor, a kódujúci najmenej jeden z definovaných polypeptidov.

Predložený vynález ďalej zahŕňa farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, ktorý obsahuje ako účinnú zložku oligonukleotidovú sekvenciu kódujúcu anti-sense sekvenciu mRNA kódujúcej definovaný polypeptid.

15 Ďalším predmetom vynálezu je použitie definovaného polypeptidu na výrobu liečiva na prevenciu alebo liečenie patologického stavu asociovaného s NF- κ B indukciou alebo s akoukoľvek inou aktivitou sprostredkovanou prostredníctvom TRAF2 alebo inými molekulami, na ktoré sa viaže takýto polypeptid, pričom takéto použitie zahŕňa podávanie účinného množstva polypeptidu alebo DNA molekuly, ktorá ho kóduje, pacientovi, ktorý to potrebuje.

20 Ďalej predložený vynález zahŕňa spôsob skríningu ligandu schopného viazať sa na definovaný polypeptid, ktorý zahŕňa uvedenie afinitnej chromatografickej matrice, na ktorú je pripojený polypeptid, do kontaktu s bunkovým extraktom na naviazanie ligandu na túto maticu, a eluovanie, izoláciu a analýzu ligandu.

25 Ďalej predložený vynález zahŕňa spôsob skríningu DNA sekvencie kódujúcej ligand schopný viazať sa na definovaný polypeptid, ktorý zahŕňa aplikáciu kvasinkového dvojhybridného postupu, pri ktorom je sekvencia kódujúca polypeptid nesená jedným hybridným vektorom a sekvencie z cDNA alebo z genomickej DNA knižnice sú nesené druhým hybridným vektorom, transformáciu kvasinkových hostiteľských buniek týmito vektormi, izoláciu pozitívne transformovaných buniek a extrakciu druhého hybridného vektora na získanie sekvencie kódujúcej uvedený ligand.

30 Ďalšie výhodné uskutočnenie vynálezu sa týka spôsobu identifikácie a produkcie molekuly schopnej priamo alebo nepriamo modulovať bunkovú aktivitu modulovanú alebo sprostredkovanú definovaným polypeptidom, pričom tento spôsob zahŕňa:

- (a) skríning molekuly schopnej modulovať aktivity modulované/sprostredkované týmto polypeptidom;
- (b) identifikáciu a charakterizáciu tejto molekuly; a
- (c) produkciu molekuly v podstate v izolovanej a purifikovanej forme.

35 Ďalším predmetom predloženého vynálezu je anti-sense oligonukleotid pozostávajúci zo sekvencie komplementárnej s aspoň časťou mRNA kódujúcej TRAF2-väzobný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:2, pričom tento anti-sense oligonukleotid je schopný účinne blokovať transláciu uvedenej mRNA.

Vynález ďalej zahŕňa tiež ďalšie hľadiská a uskutočnenia, ako vyplývajú z ďalej uvedeného podrobného opisu vynálezu.

40 Treba poznamenať, že tam, kde sa používajú v tomto spise výrazy „modulácia/sprostredkovanie TRAF (alebo TRAF2) účinku na bunky“ a akékoľvek ďalšie špecifické použitia výrazov „modulácia/sprostredkovanie“ sa tieto chápu tak, že zahŕňajú pôsobenie *in vitro*, ako aj *in vivo*, a ďalej tiež zahŕňajú inhibíciu alebo zvýšenie/posilnenie.

45 Vynález sa týka sekvencií DNA, kódujúcich proteíny, ktoré sú schopné väzby k molekule faktora združeného s receptorom nádorového nekrotizujúceho faktora (TRAF); ďalej sa týka nimi kódovaných proteínov.

Vo výhodnom uskutočnení sa vynález týka cDNA sekvencií, označovaných v tomto spise ako klon 9, klon 10 a klon 15 (sú vyznačené v obr. 3a, 4 a 5a), ktoré kódujú pre proteíny schopné väzby k TRAF2; ďalej sa týka proteínov, kódovaných uvedenými sekvenciami.

50 V ďalšom výhodnom uskutočnení sa vynález týka sekvencie DNA, kódujúcej proteín NIK a ďalej aj samotného proteínu NIK.

Uvedené DNA a uvedené odvodené aminokyselinové sekvencie sú nové sekvencie; nenachádzajú sa v bankách údajov DNA alebo aminokyselinových sekvencií „GENEBANK“ alebo v „PROTEIN BANK“.

55 V rozsahu vynálezu sú tiež zahrnuté fragmenty uvedených sekvencií DNA a sekvencie DNA, schopné hybridizácie na také sekvencie alebo ich časti, ktoré za stredne prísnych podmienok kódujú biologicky aktívny proteín, alebo polypeptid, schopný väzby k najmenej 222. až 501. aminokyseline sekvencie faktora TRAF2.

Vynález sa týka tiež sekvencie DNA, ktorá je degenerovaná ako následok genetického kódu na uvedené sekvencie DNA a ktorá kóduje biologicky aktívny proteín alebo polypeptid, schopný väzby k najmenej 222. až 501. aminokyseline sekvencie faktora TRAF2.

V spojitosti s TRAF treba poznamenať, že niekoľko členov z receptorovej skupiny TNF/NGF aktivuje transkripčný faktor NF- κ B priamym alebo nepriamym združením s TRAF2, ktorý je tak adaptorovým proteínom týchto receptorov a môže sa tak považovať tiež za modulátora/sprostredkovateľa indukcie aktivačnej NF- κ B aktivity týchto TNF/NGF receptorov (pozri schému na obr. 2 b). Iný receptor, receptor IL-1, aktivuje NF- κ B nezávisle od TRAF2. Jedno z uskutočnení výhodného TRAF väzbového proteínu v zhode s týmto vynálezom je NIK proteín, ktorý viaže NIK výnimočne špecifickým spôsobom a stimuluje NF- κ B aktivitu. NIK je serínová/treonínová kináza, ktorá má sekvenčnú podobnosť s viacerými MAPKK kinázami (bližšie pozri v ďalej uvedených príkladoch). Analógy alebo mutanty NIK, produkované podľa tohto vynálezu (pozri príklady) nemajú - ak sú tieto analógy/mutanty exprimované v bunkách - dostatočnú kinázovú aktivitu, ako má NIK a nepostačujú na stimuláciu NF- κ B aktivácie. Ďalej, ak sú uvedené analógy/mutanty exprimované v bunkách, blokujú tiež s TNF vyvolávanú NF- κ B indukciu, ako aj indukciu ďalšími indukčne pôsobiacimi látkami, ako je bakteriálny endotoxín LPS, acetát-myristát forbolu (aktivátor proteínovej kinázy C) a HTLV-1 proteín TAX. TNF indukcia aktivity NF- κ B je cez ktorýkoľvek z dvoch TNF receptorov (receptory TNF p55 a p75) a preto sa usudzuje, že analógy/mutanty NIK blokujú indukciu aktivácie NF- κ B cez tieto receptory. Podobne, TNF a FAS/APO1 receptorový ligand môžu tiež indukovať NF- κ B aktivitu cez príbuzný receptor, cez receptor FAS/APO1, ktorého indukcia sa tiež blokuje analógmi/mutantmi NIK. Uvedené receptory navyše majú adaptorové proteíny TRADD, RIP a MORT1, ktoré všetky tiež môžu indukovať NF- κ B aktivitu, ale ktorých indukcia je tiež blokovaná mutantmi/analógmi NIK. Uvedené mutanty/analógy NIK navyše blokujú tiež IL-1 spôsobovanú NF- κ B indukciu (prebiehajúcu cez IL-1 receptor). Podľa uvedeného vyplýva, že NIK sa zúčastňuje v kaskáde NF- κ B indukcie, čo je bežné pri receptoroch skupiny TNF / NGF a pri receptoroch IL-1. Usudzuje sa, že NIK pôsobí tiež priamo pri indukcii NF- κ B aktivácie, pravdepodobne zosilnením priamo I- κ B fosforylácie. Zo súčasných pozorovaní vyplýva, že uvedené analógy/mutanty NIK, keď sú exprimované v bunkách, tým, že strácajú kinázovú aktivitu (tiež sú označované ako dominantne-negatívne mutanty) neovplyvňujú nijakým spôsobom s TNF indukovanú aktiváciu kinázy Jun; táto skutočnosť poukazuje na to, že NIK pôsobí špecificky na posilnenie fosforylácie I- κ B bez ovplyvnenia MAP kinázy, ktorá je spojená s fosforyláciou Jun.

Vynález sa teda týka sekvencií DNA, kódujúcich biologicky aktívne TRAF-väzbové proteíny, napríklad TRAF2-väzbové proteíny, ako je napríklad NIK, ako aj jeho analógy, fragmenty a jeho deriváty, a analógy, fragmenty a deriváty proteínov nimi kódované. Príprava uvedených analógov, fragmentov a derivátov je možná bežnými postupmi (pozri napríklad Sambrook et al., (1989)), v ktorých v DNA- kódujúcich sekvenciách možno deletovať jeden alebo viac kodónov, pridať alebo nahradiť inými, aby sa získal kódovaný analóg, ktorý má vzhľadom na prírodný proteín najmenej jeden aminokyselinový zvyšok zmenený. Vhodné analógy sú tie, ktoré si zachovávajú prinajmenšom schopnosť väzby k TRAF2 so sprostredkovaním, alebo bez sprostredkovania niektorou ďalšou enzymatickou aktivitou, napríklad analógy, ktoré viažu TRAF2, ale neposkytujú signál, čo znamená nemožnosť sa k ďalšiemu proteínu v smere alebo k ďalšiemu faktoru, alebo nekatalyzujú signálne závislú reakciu. Týmto spôsobom sa môžu pripraviť analógy, ktoré majú takzvaný dominantne-negatívny účinok, menovite analóg, ktorý je nedostatočný buď vo väzbe k TRAF2, alebo v následnej signalizácii po takej väzbe. Také analógy možno napríklad použiť na inhibíciu účinkov CD40, p55 TNF a p75 TNF (FAS/APO1 a ďalších príbuzných receptorových účinkov, ako aj ovplyvnené sprostredkovanie rôznymi, s receptormi združenými, proteínmi (adaptory) ako už bolo uvedené, v porovnaní s prírodnými TRAF2-väzbovými proteínmi. Obdobne možno pripraviť takzvané dominantne-pozitívne analógy, ktoré môžu slúžiť na posilnenie účinku TRAF2. Tieto majú rovnaké alebo lepšie TRAF2-väzbové vlastnosti a rovnaké alebo lepšie signálne vlastnosti ako prírodné TRAF2-väzbové proteíny. Obdobným spôsobom, možno pripravovať biologicky aktívne fragmenty klonov podľa tohto vynálezu, ako sa uvádza v súvislosti s prípravou analógov. Vhodné fragmenty sekvencií DNA podľa tohto vynálezu sú tie, ktoré kódujú proteín alebo polypeptid, uchovávajúci TRAF2-väzbovú schopnosť, alebo ktorý môže sprostredkovať akúkoľvek inú väzbovú alebo enzymatickú aktivitu, ako sa uvádzajú skôr. Podľa uvedeného sa môžu pripraviť fragmenty kódovaných proteínov podľa tohto vynálezu, ktoré majú dominantne-negatívny alebo dominantne-pozitívny účinok, ako sa uviedlo pri analógoch. Podobne sa môžu pripraviť deriváty v odbore dobre známymi spôsobmi bežnou modifikáciou vedľajších skupín jedného alebo viacerých aminokyselinových zvyškov proteínov, ich analógov alebo fragmentov, alebo združením proteínov, ich analógov alebo fragmentov s inou molekulou, napríklad s molekulou protilátka, enzýmu, receptora a podobne.

K uvedeným sekvenciám DNA podľa tohto vynálezu, ktoré kódujú TRAF-väzbový proteín (napríklad TRAF2-väzbový proteín, ako je napríklad NIK), jeho izoformu, analóg, fragment alebo jeho derivát, sa ako uskutočnenie tohto vynálezu tiež zahŕňa sekvencia DNA, schopná hybridizácie s cDNA sekvenciou, odvodenou z kódujúcej oblasti prírodného TRAF-väzbového proteínu, v ktorom sa vykoná hybridizácia v stredne prísnych podmienkach, a ktorého hybridizovateľné sekvencie kódujú biologicky aktívny TRAF-väzbový proteín. Uvedené hybridizovateľné sekvencie DNA preto zahŕňajú sekvencie DNA, ktoré majú pomerne vysokú homológiu s cDNA sekvenciou prírodných TRAF-väzbových proteínov (napríklad cDNA

sekvencia TRAF2-väzbového proteínu, ako je napríklad cDNA sekvencia NIK-u) samy o sebe predstavujú sekvencie, podobné TRAF-väzbovým proteínom, ktoré môžu byť odvodené napríklad z prírodných sekvencií, kódujúcich rôzne TRAF-väzbové proteínové izoformy, alebo v prírode sa nachádzajúce sekvencie kódujú-
 5 cich proteínov, ktoré majú aktivitu TRAF-väzbových proteínov (napríklad TRAF2-väzbového proteínu, ako je napríklad NIK). Ďalej, tieto sekvencie môžu tiež zahŕňať napríklad v prírode sa nenachádzajúce synteticky pripravené sekvencie, ktoré sú podobné prírodnej TRAF-väzbovej proteínovej cDNA sekvencii, ale majú za-
 budované niekoľko vhodných modifikácií. Uvedené syntetické sekvencie preto zahŕňajú všetky možné kódu-
 júce sekvencie analógov, fragmentov a derivátov TRAF-väzbových proteínov (napríklad TRAF2 väzbové
 proteíny, ako je napríklad NIK), ktoré majú aktivitu TRAF-väzbových proteínov.

Na získanie rôznych, skôr uvedených, v prírode sa nachádzajúcich sekvencií podobných TRAF-väzbo-
 vým proteínom sa môžu použiť v odbore bežné spôsoby skríningu a izolácie prírodných DNA alebo RNA
 vzoriek z rôznych tkanív s použitím prírodnej cDNA prírodného TRAF-väzbového proteínu, alebo jeho časti
 ako sondy (pozri napríklad bežné spôsoby, uvádzané v Sambrook et al., (1989)).

Podobne na prípravu uvedených syntetických sekvencií, podobných TRAF-väzbovým proteínom, kódu-
 15 júcich analógy, fragmenty alebo deriváty TRAF-väzbových proteínov (napríklad TRAF2-väzbový proteín,
 ako je napríklad NIK), sa môže použiť celý rad bežných spôsobov, ako sa podrobnejšie uvádzajú v ďalšom
 texte, ktorý sa týka prípravy takých analógov, fragmentov a derivátov.

Polypeptid alebo proteín, „v podstate zodpovedajúci“ TRAF-väzbovému proteínu zahŕňa nielen TRAF-
 -väzbový proteín, ale aj polypeptidy alebo proteíny, ktoré sú analógmi TRAF-väzbového proteínu.

Analógy, ktoré v podstate zodpovedajú TRAF-väzbovému proteínu sú tie polypeptidy, v ktorých jedna
 20 alebo viac aminokyselín aminokyselinových sekvencií TRAF-väzbového proteínu bolo nahradených inou
 aminokyselinou, deletovaných a/alebo inzertovaných za predpokladu, že výsledný proteín má v podstate rov-
 nakú alebo vyššiu biologickú aktivitu ako TRAF-väzbový proteín, ktorému zodpovedá.

Aby sekvencia TRAF-väzbových proteínov, ako sú izoformy, v podstate zodpovedala TRAF-väzbovému
 25 proteínu, zmeny v sekvencii sú vo všeobecnosti pomerne malé. Hoci počet zmien môže byť viac ako desať,
 výhodné je, ak ich počet nebude viac ako desať, výhodnejšie nie viac ako päť a najvýhodnejšie nie viac ako
 tri zmeny. Na vyhľadávanie potenciálne biologicky aktívnych proteínov, ktoré v podstate zodpovedajú
 TRAF-väzbovým proteínom, možno použiť ktorúkoľvek techniku; jednou z uvedených techník je bežná mu-
 tagenézna technika na DNA, kódujúcej proteín. Uvedenými klonmi exprimované proteíny sa potom môžu
 30 vytriediť podľa ich schopnosti viazať sa k TRAF proteínom (napríklad TRAF2) a podľa modulácie aktivity
 TRAF proteínu (napríklad TRAF2) pri modulácii/sprostredkovaní intracelulárnych dráh, ako sa uvádza.

„Konzervatívne“ zmeny sú také zmeny, pri ktorých sa neočakáva, že zmenia aktivitu proteínu a sú zvy-
 čajne prvé pri skríningu, pretože sa pri nich nepredpokladá zmena veľkosti, náboja alebo konfigurácie proteí-
 nu a tak sa neočakáva, že by zmenili jeho biologické vlastnosti.

Konzervatívne substitúcie TRAF-väzbových proteínov zahŕňajú analóg, v ktorom najmenej jeden amino-
 35 kyselinový zvyšok bol konzervatívne nahradený inou aminokyselinou. Takéto substitúcie sa výhodne vyko-
 najú v zhode so zoznamom, ako je uvedený v tabuľke IA; uvedené substitúcie môžu byť určené bežným ex-
 perimentálnym postupom tak, aby poskytli modifikované štruktúrne a funkčné vlastnosti syntetizovanej po-
 lypeptidovej molekuly, ale aby sa zachovala biologická aktivita, charakteristická pre TRAF-väzbový proteín.

Tabuľka IA

Pôvodný zvyšok	Príklad substi- túcie	Pôvodný zvyšok	Príklad substi- túcie	Pôvodný zvyšok	Príklad substi- túcie
Ala	Gly;Ser	Gly	Ala;Pro	Ser	Thr
Arg	Lys	His	Asn;Gln	Thr	Ser
Asn	Gln;His	Ile	Leu;Val	Trp	Tyr
Asp	Glu	Leu	Ile;Val	Tyr	Trp;Phe
Cys	Ser	Lys	Arg;Gln;Glu	Val	Ile;Leu
Gln	Asn	Met	Leu;Tyr;Ile		
Glu	Asp	Phe	Met;Leu;Tyr		

Inou skupinou substitúcií TRAF-väzbového proteínu sú voliteľne také substitúcie, v ktorých najmenej je-
 45 den aminokyselinový zvyšok polypeptidu bol odstránený a na jeho miesto bol vložený iný zvyšok v zhode s
 tabuľkou IB. Možné typy substitúcií v polypeptide môžu byť založené na analýze frekvencií aminokyselinov-
 ých zmien medzi homológym proteínom iného druhu, ako sú proteíny uvedené v tabuľke 1-2 v knihe
 Schulza et al., G.E., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, (1988) a na obrazoch 3 až 9
 v knihe Creightona, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francis-
 co, CA (1983). Na základe takýchto analýz sú tu určené voliteľné konzeratívne substitúcie ako výmeny v
 50 rámci jednej z nasledujúcich piatich skupín.

Tabuľka IB

Skupina	Substituujúce zvyšky
1	nízke alifatické, nepolárne alebo slabo polárne zvyšky: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2	Polárne zvyšky s negatívnym nábojom a ich amidy: Asp, Asn, Glu, Gln
3	Polárne zvyšky s kladným nábojom: His, Arg, Lys
4	vyššie alifatické nepolárne zvyšky: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5	Veľké aromatické zvyšky: Phe, Tyr, Trp

Tri aminokyselinové zvyšky uvedené v tab. IB v zátvorkách majú špeciálnu úlohu v architektúre proteínov. Gly je jediný proteín, ktorý nemá vedľajší reťazec a tak jeho reťazec je značne flexibilný. To však vedie k podpore vzniku inej sekundárnej štruktúry, ako je α -závitovka. Pro silne obmedzuje reťazec pre jeho ne-
zvyčajnú geometriu a vo všeobecnosti má snahu podporovať podobné ako β -otáčavé štruktúry, hoci Cys v
niektorých prípadoch môže byť schopný sa zúčastňovať na vzniku disulfidovej väzby, ktorá je dôležitá pri
skladaní proteínov. Upozorňujeme, že Schulz et al., *ibid*, spája uvedené skupiny 1 a 2. Treba tiež pozname-
nať, že Tyr má pre jeho potenciál vytvárať vodíkovú väzbu významnú príbuznosť s Ser a Thr a ďalšími.

Konzervatívne aminokyselinové substitúcie podľa tohto vynálezu, napríklad ako sa uvádzajú, sú v odbore
známe a predpokladá sa, že aj po amino-kyselinovej substitúcii zachovávajú biologické a štruktúrne vlastnosti
polypeptidu. Väčšina delécií a substitúcií podľa tohto vynálezu sú také, pri ktorých nenastávajú radikálne
zmeny v charaktere proteínovej alebo polypeptidovej molekuly. „Charakter“ je definovaný ne-inkluzívnym
spôsobom, aby definoval aj zmeny v sekundárnej štruktúre, napríklad α -závitovku alebo β -list, ako aj zmeny
v biologickej aktivite, napríklad vo väzbovosti k TRAF proteínom a/alebo v sprostredkovaní TRAF-
proteínového účinku na smrť buniek.

Príklady uskutočnení aminokyselinových substitúcií v proteínoch, ktoré možno použiť na prípravu analó-
gov TRAF-väzbových proteínov na použitie podľa tohto vynálezu zahŕňajú ktorékoľvek známe reakčné kro-
ky, ako sú uvádzané v patente USA RE 33 653, 4 959 314, 4 588 585 a 4 737 462 od Marka et al.; 5 116 943
od Kothsa et al.; 4 965 195 od Namena et al.; 4 879 111 od Chonga et al., a 5 017 691 od Lee et al.; a lyzínom
substituované proteíny, uvádzané v patente USA 4 904 584 (Shaw et al.).

Popri diskutovaných konzervatívnych substitúciách, ktoré nemenia významne aktivitu TRAF-
vážbového proteínu, sú v rozsahu tohto vynálezu zahrnuté tiež konzervatívne substitúcie alebo menej konz-
ervatívne a viac náhodné zmeny, ktoré vedú k zvýšeniu biologickej aktivity analógov TRAF-vážbových
proteínov.

Na potvrdenie presného účinku substitúcie alebo delécie odborník v danom odbore uznáva, že účinok
substitúcie (substitúcií), delécie (delécií) a podobných zmien sa hodnotí bežnými väzbovými pokusmi s vy-
hodnocovaním prežitia a smrti buniek. Skríning pomocou uvedených postupov nevyžaduje nepotrebné expe-
rimentovanie.

Na genetickej úrovni sa uvedené analógy vo všeobecnosti pripravujú polohovo-usmernou mutagénou
nukleotidov v DNA, kódujúcej TRAF-vážbový proteín, pričom sa produkuje DNA, kódujúca uvedený ana-
lóg; potom sa syntetizuje DNA a exprimuje polypeptid v rekombinantnej bunkovej kultúre. Uvedené analógy
typicky vykazujú kvalitatívne rovnakú alebo vyššiu biologickú aktivitu ako proteíny, vyskytujúce sa v príro-
de (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laborato-
ry Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)).

Príprava TRAF-vážbových proteínov v zhode s uvedenou alebo voliteľnou nukleotidovou sekvenciou,
kódujúcou rovnaký polypeptid, ale odlišujúcich sa od prírodnej sekvencie v dôsledku zmien umožnených
známym degenerovaním genetického kódu sa môže uskutočniť polohovo-špecifickou mutagénou DNA,
ktorá kóduje vopred pripravený analóg alebo prírodnú verziu TRAF-vážbového proteínu. Polohovo-
špecifická mutagénza umožňuje produkciu analógov použitím špecifických oligonukleotidových sekvencií,
ktoré kódujú sekvenciu DNA vyžadovanej mutácie, ako aj dostatočný počet susedných nukleotidov, čím sa
získa sekvencia primeru dostatočnej veľkosti a sekvenčnej úplnosti, aby vytvárala stabilný duplex priečne na
obidvoch stranách delečného spoja. Výhodná dĺžka primeru je typicky okolo 20 až 25 nukleotidov, s približ-
ne 5 až 10 komplementárnymi nukleotidmi na každej strane zmenenej sekvencie. Vo všeobecnosti je techni-
ka polohovo-špecifickej mutagénzy v odbore dobre známa, čo možno uviesť na príklade publikácií, ako je
Adelman et al., DNA 2, 183 (1983), ktorej zverejnenie sa tu zahŕňa týmto odkazom.

Technika polohovo-špecifickej mutagénzy typicky využíva fágový vektor, ktorý jestvuje v obidvoch
formách: jednovláknovej aj dvojvláknovej forme. Typické vektory, ktoré sú užitočné pri polohovo usmerne-
nej mutagénze zahŕňajú napríklad fág M13, čo zverejnil Messing et al., Third Cleveland Symposium on
Macromolecules and Recombinant DNA, Ed.: Walton A., Elsevier, Amsterdam (1981); táto publikácia sa za-

hŕňa týmto odkazom. Tieto fágy sú komerčne ľahko dostupné a ich použitie je všeobecne dobre známe odborníkom v danej oblasti. Voliteľne sa na prípravu jednovláknových DNA môžu použiť plazmidové vektory, ktoré obsahujú jednovláknový fágový replikačný začiatok (Veira et al., Meth. Enzymol. 153, 3 (1987)).

Vo všeobecnosti sa v zhode s doteraz uvedeným môže polohovo usmernená mutagenéza vykonať najprv získaním jednovláknového vektora, ktorý zahŕňa v rámci jeho sekvencie sekvenciu DNA, ktorá kóduje relevantný polypeptid. Automatizovanou DNA/nukleotidovou syntézou sa synteticky pripraví oligonukleotidový primér, ktorý nesie vyžadovanú mutantnú sekvenciu. Tento primér sa potom spracuje s vektorom, obsahujúcim jednovláknovú proteínovú sekvenciu a na dokončenie syntézy vlákna s mutáciou sa vystaví účinku DNA-polymerizujúcich enzýmov, ako je Klenow fragment polymerázy I *E. coli*. Mutantná sekvencia a druhé vlákno nesú vyžadovanú mutáciu. Tento heteroduplexný vektor sa potom použije na transformáciu vhodných buniek, ako sú bunky JM 101 *E. coli*; selektujú sa klony, ktoré obsahujú rekombinantné vektory, ktoré sú nositeľmi mutantných usporiadaní sekvencií.

Mutantná sekvencia TRAFG-väzbového proteínu sa po selekcii klonu môže odobrať a vložiť do príslušného vektora, všeobecne do prenosového alebo expresného vektora takého typu, ktorý sa môže použiť na transfekciu vhodného hostiteľa.

Použitím známych DNA alebo RNA amplifikačných techník, ako je PCR a oligonukleotidová syntéza možno *in vitro*, *in situ* a/alebo *in vivo* tiež detegovať, pripraviť a/alebo modifikovať génovú alebo nukleovú kyselinu, kódujúcu pre TRAF-väzbový proteín. PCR umožňuje amplifikáciu špecifických sekvencií opakovaním DNA polymerázových reakcií. Tieto reakcie sa môžu použiť ako náhrada klonovania; všetko, čo na to treba, je znalosť sekvencie nukleových kyselín. Na vykonanie PCR sa označili priméry, ktoré sú komplementárne k predmetnej sekvencii. Uvedené priméry sa potom ďalej generovali automatizovanou DNA syntézou. Pretože sa priméry môžu označiť tak, aby hybridizovali ktorúkoľvek časť génu, podmienky sa vyberú tak, aby sa mohli tolerovať nesúlady (mismatches) v párovaní komplementárnych báz. Amplifikácia týchto nesúladných oblastí môže viesť k syntéze mutagenizovaných produktov, ktorých výsledkom je generácia peptidu s novými vlastnosťami (polohovo usmernená mutagenéza). Pozri tiež napríklad Ausubel, *ibid*, Ch. 16. Ako východiskový materiál na syntézu extracelulárnej domény prolaktínového receptora bez klonovania možno tiež použiť RNA, ak sa spojí syntéza komplementárnej DNA (cDNA) s použitím reverznej transkriptázy, s PCR.

Priméry PCR sa ďalej môžu vyznačiť tak, aby zahŕňali nové reštrikčné miesta, alebo ďalšie znaky, ako sú terminačné kodóny na koncoch amplifikovaného génového segmentu. Umiestenie reštrikčných miest na 5' a 3' koncoch amplifikovanej génovej sekvencie umožňuje, aby génové segmenty, kódujúce TRAF-väzbový proteín, alebo jeho fragment, boli vo vektoroch ako zvyčajne použiteľné na ligáciu ďalších sekvencií a/alebo klonovacích miest.

PCR a ďalšie spôsoby amplifikácie RNA a/alebo DNA sú v odbore dobre známe a môžu sa bez nadmerného experimentovania použiť v zhode s týmto vynálezom, s využitím usmernenia a návodov z tohto textu. Známe spôsoby amplifikácie DNA alebo RNA zahŕňajú, ale nie sú na uvedené obmedzené, polymerázovú reťazcovú reakciu (PCR) a príbuzné amplifikačné postupy (pozri napríklad patenty USA 4 683 195, 4 683 202, 4 800 159, 4 965 188 od Mullisa et al.; 4 795 699 a 4 921 794 od Tabora et al.; 5 142 033 od Innisa; 5 122 464 od Wilsona et al.; 5 091 310 od Innisa; 5 066 584 od Gyllenstena et al.; 4 889 818 od Gelfanda et al.; 4 994 370 od Silvera et al.; 4 766 067 od Biswasa; 4 656 134 od Ringolda; a Innis et al., Eds., PCR Protocols: A Guide to Method and Applications) a RNA sprostredkovanú amplifikáciu, ktorá využíva protismernú RNA na terčovú sekvenciu ako templát na syntézu dvojvláknovej DNA (patent USA 5 130 238 od Maleka et al., s obchodným názvom NASBA); a imuno-PCR, ktorá kombinuje použitie DNA amplifikácie s protilátkovým značením (Ružička et al., Science 260, 487 (1993); Sano et al., Science 258, 120 (1992); Sano et al., Biotechniques 9, 1378 (1991)); obsah uvedených patentov a literatúry sa v celosti zahŕňa týmto odkazom.

Obdobným spôsobom, ako sa uvádza pre analógy TRAF-väzbových proteínov, sa môžu pripraviť biologicky aktívne fragmenty TRAF-väzbových proteínov (napríklad niektorých z TRAF2-väzbových proteínov, ako je napríklad NIK, alebo jeho izoformy). Vhodné fragmenty TRAF-väzbových proteínov sú také, ktoré si uchovávajú väzbovú schopnosť TRAF-väzbových proteínov a ktoré môžu priamo alebo nepriamo sprostredkovať biologickú aktivitu TRAF proteínov alebo iných proteínov, združených s proteínmi TRAF. Podľa uvedeného sa môže pripraviť fragment TRAF väzbového proteínu, ktorý má dominantne negatívny alebo dominantne pozitívny účinok, obdobne ako sa uvádza skôr pre analógy. Treba poznamenať, že tieto fragmenty predstavujú podľa tohto vynálezu osobitnú skupinu analógov; sú definované ako časti TRAF-väzbových proteínov, odvodených z úplných sekvencií TRAF-väzbových proteínov (napríklad z niektorého z TRAF2-väzbových proteínov, napríklad z NIK alebo jeho izoformiem), každá taká časť či fragment má každú z uvedených vyžadovaných aktivít. Takým fragmentom môže byť napríklad peptid.

Podobne sa môžu pripraviť deriváty bežnými modifikáciami vedľajších skupín jednej alebo viacerých aminokyselinových zvyškov TRAF-väzbového proteínu, jeho analógov alebo fragmentov, alebo spojením TRAF-väzbového proteínu, jeho analógov alebo fragmentov s ďalšou molekulou, napríklad protilátkou, en-

zýmu, receptora a podobne, spôsobmi, ktoré sú v odbore dobre známe. Výraz „deriváty“ sa v tomto texte používa tak, že zahŕňa deriváty, ktoré sa môžu pripraviť z funkčných skupín, ktoré sa nachádzajú na vedľajších reťazcoch zvyškov alebo na terminálnych N- alebo C- skupinách, spôsobmi, ktoré sú v odbore známe a ktoré sa zahŕňajú do tohto vynálezu. Deriváty môžu mať chemickú stavbu glycidových alebo fosfátových zvyškov za predpokladu, že také zoskupenia majú rovnakú alebo vyššiu biologickú aktivitu, ako je aktivita TRAF-
 5 -väzbových proteínov.

Deriváty môžu napríklad zahŕňať alifatické estery karboxylových skupín, amidy karboxylových skupín, pripravené reakciou s amoniakom alebo s primárnymi alebo sekundárnymi aminmi, N-acylderiváty alebo voľné aminové skupiny aminokyselinových zvyškov vytvorené s acylovými zoskupeniami (napríklad alkanoylové alebo karbocyklické aroylové skupiny), alebo O-acyl deriváty voľných hydroxylových skupín (napríklad serylové alebo treonylové zvyšky), vytvorené s acylovými zoskupeniami.

Výraz „derivát“ je mienený tak, že zahŕňa iba tie deriváty, v ktorých sa nezamieňa jedna aminokyselina za inú z dvadsiatich bežne sa vyskytujúcich prírodných aminokyselín.

TRAF-väzbový proteín je proteín alebo polypeptid, to znamená sekvencia aminokyselinových zvyškov. Polypeptid obsahujúci väčšiu sekvenciu, ktorá zahŕňa úplnú sekvenciu TRAF-väzbového proteínu, v zhode s definíciami v tomto vynáleze, sa tiež považuje za zahrnutý vo význame takeého polypeptidu potiaľ, pokiaľ jeho zväčšenie neovplyvňuje základné a nové vlastnosti podľa tohto vynálezu, to znamená, ak buď zachováva alebo zvyšuje biologickú aktivitu TRAF-väzbového proteínu, alebo môže byť štiepený na proteín alebo polypeptid s biologickou aktivitou TRAF-väzbového proteínu. Potom napríklad sa rozumie, že tento vynález zahŕňa fúzné proteíny TRAF-väzbového proteínu s ďalšími aminokyselinami alebo peptidmi.

Ako už bolo uvedené, uvedený výraz „TRAF-väzbové“ proteíny treba chápať tak, že podľa tohto vynálezu sú to akékoľvek proteíny, ktoré môžu viazať a intracelulárne sprostredkovať/modulovať aktivitu ktoréhokoľvek TRAF proteínu. Konkrétne príklady sú TRAF2-väzbové proteíny, ktoré môžu modulovať alebo sprostredkovať s TRAF2 združenú intracelulárnu signálnu aktivitu, ako sa uvádza, najmä pokiaľ sa týka účasti TRAF2 v indukcii NF- κ B aktivity, konkrétne interakciou medzi TRAF2 a rôznymi členmi skupiny TNF/NGF receptorov a/alebo s nimi združenými adaptorovými proteínmi, ako sa podrobnejšie uvádza aj v ďalšom texte. Špecifickým príkladom uvedených TRAF2-väzbových proteínov je proteín NIK a jeho rôzne analógy, fragmenty a ďalšie (pozri príklady), ktorý sa javí ako vysoko špecifický pri väzbe TRAF2 a ako priamo pôsobiaci pri indukcii NF- κ B aktivity, s rôznymi NIK dominantne negatívnymi analógmi/mutantmi, blokujúcimi uvedenú aktivitu.

Všetky uvedené modifikácie sú v rozsahu tohto vynálezu za predpokladu, že si uchovávajú schopnosť kódovať proteíny alebo polypeptidy, alebo ich analógy a ich deriváty na väzbu k najmenej 222. až 501. aminokyseline sekvencie TRAF2.

Všetky proteíny a polypeptidy podľa tohto vynálezu sa vďaka ich účinnej schopnosti väzby k TRAF2 považujú za mediátory alebo modulátory signalizácie TRAF2. Uvedené molekuly podľa tohto vynálezu samy osebe majú úlohu napríklad v signálnom procese, v ktorom viazanie TRAF2 ligandu k CD30, CD40, lymfotóxi-novému beta (LT- β) receptoru, p55 alebo p75 receptorom, ako aj ďalším receptorom a adaptorovým proteínom, uvedeným skôr, vedie k aktivácii transkripčného faktora NF- κ B. Zaujímavý je najmä proteín NIK a čiastkový proteín NIK, kódovaný klonom 10 podľa tohto vynálezu; podrobná sekvenčná analýza NIK a tohto vynájdeného klonom 10 kódovaného proteínu (pôvodne označeného NMPI) objasnila kódované aminokyselinové sekvencie, zodpovedajúce I. až XI. konzervatívnym zoskupeniam, charakteristickým pre Ser/Thr proteínové kinázy, a tak určila funkciu tohto proteínu.

Nové klony proteínov, ich analógov, fragmentov a derivátov majú množstvo možných použití, napríklad:

(i) môžu sa použiť na zníženie alebo zvýšenie aktivity NF- κ B, funkcie TRAF2 a receptorov, ku ktorým sa viažu, v situáciách, kedy je vyžadovaná zvýšená ich funkcia; to nastáva napríklad pri protinádorových alebo imunostimulačných aplikáciách, keď sa vyžadujú vplyvy, indukované účinkom TRAF2. V tomto prípade sa môžu proteíny podľa tohto vynálezu, ich analógy, fragmenty alebo deriváty, ktoré zvyšujú účinky TRAF2 alebo receptorov, vložiť do buniek bežnými spôsobmi, známymi *per se*. Napríklad, ak proteíny kódované DNA klonmi podľa tohto vynálezu sú intracelulárne a majú byť vložené iba do buniek, v ktorých sa vyžaduje účinok TRAF2, potom je nevyhnutný systém na špecifické vloženie týchto proteínov do buniek. Jeden spôsob, ako to dosiahnuť, je vytvorenie rekombinantného živočíšneho vírusu, napríklad vírusu odvodeného z *Vaccinia*; do jeho DNA sa vložia dva gény: gén, kódujúci ligand, ktorý sa špecificky viaže k proteínom povrchu bunky, exprimovaný bunkami, ako je napríklad gp120 proteín vírusu AIDS (HIV), ktorý sa špecificky viaže k niektorým bunkám (k CD4 lymfocytom a príbuzným leukémiám) alebo akýkoľvek iný ligand, ktorý sa špecificky viaže k bunkám, ktoré sú nositeľmi receptora, ktorý viaže TRAF2 tak, že rekombinantný vírusový vektor bude schopný väzby s uvedenými bunkami; a gén, kódujúci proteíny podľa tohto vynálezu. Expresia proteínu viažuceho sa na povrch bunky potom na povrchu vírusu špecificky zasiahne vírus v nádorovej bunke alebo v inej bunke nesúcej receptor; potom sa proteíny kódujúce sekvencie vložia do buniek cez vírus a po expresii v bunkách je výsledkom zosilnenie receptora alebo účinku TRAF2, čo vedie k vyžadovanému imunostimulačnému účinku v týchto bunkách. Konštrukcia uvedených rekombinantných živočíšnych vírusov

sa vykoná bežnými spôsobmi (pozri napríklad Sambrook et al., (1989)). Iná možnosť je vložiť sekvenciu kódovaných proteínov vo forme oligonukleotidov, ktoré môžu byť absorbované bunkami a v nich exprimované.

(ii) Môžu sa použiť na inhibíciu NF- κ B aktivity, účinkov TRAF2 alebo receptora, ktorý ho viaže, napríklad v prípadoch poškodenia tkaniva, ako je AIDS, septický šok alebo odmietavá reakcia hostiteľa proti štep-
 5 pu, pri ktorej sa vyžaduje blokovanie vyvolanej intracelulárnej signalizácie. V tejto situácii možno napríklad vložiť bežnými spôsobmi do buniek oligonukleotidy, ktoré majú protismernú kódujúcu sekvenciu proteínov podľa tohto vynálezu, ktoré budú účinne blokovať transláciu mRNA, kódujúcich proteíny a tým blokovat' ich expresiu, ktorá vedie k inhibícii nežiaduceho účinku. Alternatívne sa môžu použiť ďalšie oligonukleotidy; oligonukleotidy, ktoré si zachovávajú svoju schopnosť väzby k TRAF2 takým spôsobom, že interferujú s
 10 väzbou molekúl k uvedenému proteínu, zatiaľ čo súčasne nesprostredkujú nijakú aktiváciu alebo moduláciu tejto molekuly. Uvedené molekuly s týmito vlastnosťami môžu rušiť interakciu TRAF2 s jeho prirodzeným ligandom, a preto môžu pôsobiť ako inhibítory, schopné odstraňovať vplyvy sprostredkované TRAF2, ako je napríklad aktivácia NF- κ B. Uvedené oligonukleotidy sa môžu do buniek vložiť použitím uvedeného prístupu s rekombinantným vírusom, druhá sekvencia nesená vírusom je potom oligonukleotidová sekvencia.
 15 Ďalšia možnosť je použitie protilátok, špecifických k proteínom podľa tohto vynálezu, na inhibíciu ich intracelulárnej signálnej aktivity.

Ešte ďalší spôsob inhibície nežiaducich účinkov je nedávno vyvinutým ribozýmovým prístupom. Ribozýmy sú katalytické RNA molekuly, ktoré sú schopné špecificky štiepiť RNA. Ribozýmy môžu byť zostrojené tak, aby štiepli cieľové RNA podľa výberu, napríklad mRNA kódujúce proteíny podľa tohto vynálezu.
 20 Ribozýmy majú mať sekvenciu špecifickú pre mRNA proteínov a majú byť schopné vstupovať s nimi do interakcie (komplementárna väzba), potom nasleduje štiepenie mRNA, čoho výsledkom je zníženie (alebo úplná strata) expresie proteínov; úroveň poklesu expresie bude závislá od úrovne ribozýmovej expresie v terčových bunkách. Na zavedenie ribozýmov do vybraných buniek (napríklad do buniek, ktoré nesú TRAF2-väzbové proteíny) sa môže použiť ktorýkoľvek vhodný vektor, napríklad plazmid, živočíšne vírusové (retrovírus) vek-
 25 tory, ktoré sa zvyčajne používajú na tento účel (pozri tiež odsek (i) hore, kde vírus má ako druhú sekvenciu cDNA, kódujúcu vybranú ribozýmovú sekvenciu). (Prehľadné práce, spôsoby a podobné, pozri Chen et al., (1992); Zhao a Pick, (1993)).

(iii) Môžu sa použiť na izoláciu, identifikáciu a klonovanie ďalších proteínov, ktoré sú schopné ich viazať, napríklad ďalších proteínov, ktoré sú v smere TRAF2 a sú zapojené do intracelulárneho signálneho procesu. DNA sekvencie, kódujúce proteíny podľa tohto vynálezu, sa môžu napríklad použiť v kvasinkových dvojhybridných systémoch, v ktorých sa uvedené kódované proteíny môžu použiť ako „návnada“ („bait“) na izoláciu, klonovanie a identifikáciu ďalších sekvencií („koristi“ („preys“) kódujúcich proteínov z cDNA knižnice alebo genómovej knižnice, ktoré sa môžu viazať ku klonovým proteínom. Rovnakým spôsobom sa môže tiež stanoviť, či sa proteíny podľa tohto vynálezu môžu viazať k ďalším bunkovým proteínom, napríklad k ďalším receptorom skupiny TNF / NGF receptorov.
 35 klad k ďalším receptorom skupiny TNF / NGF receptorov.

(iv) Uvedené kódované proteíny, ich analógy, fragmenty alebo ich deriváty sa môžu použiť tiež na izoláciu, identifikáciu a klonovanie ďalších proteínov z rovnakej skupiny proteínov, to znamená proteínov, ktoré sa viažu k TRAF2 alebo k funkčne príbuzným proteínom a sú zapojené v intracelulárnom signálnom procese. Pri tomto použití sa môže použiť už uvedený kvasinkový dvojhybridný systém, alebo sa môže použiť nedávno vyvinutý systém, využívajúci nestringentnú hybridizáciu Southernovým prenosom s nasledujúcim PCR klonovaním (Wilks et al. (1989)).
 40 klonovaním (Wilks et al. (1989)).

(v) Ďalší prístup na využitie uvedených kódovaných proteínov podľa tohto vynálezu, ich analógov, fragmentov alebo ich derivátov je ich použitie v postupoch afinitnej chromatografie na izoláciu a identifikáciu iných proteínov alebo faktorov, ku ktorým sú schopné sa viazať, napríklad na izoláciu a identifikáciu proteínov príbuzných k TRAF2 alebo iných proteínov alebo faktorov, zapojených do intracelulárneho signálneho procesu. Pri tomto použití sa proteíny, ich analógy, fragmenty alebo ich deriváty podľa tohto vynálezu môžu jednotlivito naviazať na afinitne chromatografickú maticu a potom priviesť do styku s bunkovými extraktmi alebo izolovanými proteínmi alebo faktormi, považovanými za také, ktoré sú zapojené do intracelulárneho signálneho procesu. Po rozdelení afinitnou chromatografiou sa uvedené iné proteíny, ich analógy, fragmenty alebo deriváty podľa tohto vynálezu môžu eluovať, izolovať a charakterizovať.
 45 izolovať a charakterizovať.

(vi) Ako už bolo uvedené, uvedené proteíny, ich analógy, fragmenty alebo ich deriváty podľa tohto vynálezu môžu sa použiť tiež ako imunogény (antigény) na produkciu k nim špecifických protilátok. Tieto protilátky sa môžu použiť tiež na čistenie proteínov podľa tohto vynálezu buď z bunkových extraktov, alebo z transformovaných bunkových línií, ktoré produkujú uvedené proteíny, ich analógy, alebo ich fragmenty. Tieto protilátky možno ďalej použiť na diagnostické účely na identifikáciu porúch spojených s abnormálnymi funkciami receptorového systému, pri ktorých ich spôsobujú, napríklad, hyperaktívne alebo hypoaktívne, s TRAF2 indukované, činnosti bunky. Ak uvedené poruchy môžu súvisieť so zle pracujúcim intracelulárnym signálnym systémom, v ktorom sú zapojené proteíny z tohto vynálezu, tak uvedené protilátky budú slúžiť ako významný diagnostický prostriedok. Výraz „protilátka“ sa používa v takom význame, že zahŕňa polyklonové protilátky, monoklonové protilátky (mAbs), chimérové protilátky, anti-idiotypové (anti-Id) protilátky k
 50 klonové protilátky, monoklonové protilátky (mAbs), chimérové protilátky, anti-idiotypové (anti-Id) protilátky k

protilátkam, ktoré môžu byť značené v rozpustnej alebo viazanej forme, ako aj ich fragmenty, ako sú napríklad Fab a F(ab')₂-fragmenty bez Fc fragmentu úplnej protilátky, ktoré sú schopné viazať antigén.

(vii) Uvedené protilátky vrátane fragmentov protilátok, ktoré sú užitočné v tomto vynáleze sa môžu použiť na kvantitatívne stanovenie a kvalitatívny dôkaz klonov z tohto vynálezu vo vzorke, alebo na dôkaz prítomnosti buniek, ktoré exprimujú uvedené klonov z tohto vynálezu. Môže sa to vykonať imuno-fluorescenčnými technikami, využívajúcimi fluorescenčne značenú protilátku v spojení s detekciou pomocou svetelnej mikroskopie, prietokovou cytometriou, alebo fluorometricky.

Uvedené protilátky (alebo ich fragmenty), užitočné v tomto vynáleze sa môžu využiť histologicky, ako napríklad v imuno fluorescencii alebo v imuno elektrónovej mikroskopii, na detekciu *in situ* klonov podľa tohto vynálezu. Detekcia *in situ* sa môže vykonať odobratím histologickej vzorky pacienta a dodaním značenej protilátky podľa tohto vynálezu do uvedenej vzorky. Uvedená protilátka (alebo jej fragment) sa výhodne dodáva nanesením alebo prevrstvením značenej protilátky (alebo fragmentu) na biologickú vzorku. Použitím uvedeného postupu možno stanovovať nielen prítomnosť určitých klonov, ale tiež ich rozdelenie na skúšanom tkanive. Pri používaní tohto vynálezu si bežne skúsení odborníci v danej oblasti uvedomia, že každý z početných rozdielnych histologických postupov (ako sú napríklad farbiace postupy) možno modifikovať tak, aby sa dosiahla detekcia *in situ*.

Uvedené skúšky na klonov podľa tohto vynálezu typicky zahŕňajú inkubáciu biologickú vzorku, ako je napríklad biologická tekutina, tkanivový extrakt, čerstvo odobraté bunky, ako sú lymfocyty alebo leukocyty, alebo bunky, ktoré boli inkubované v tkanivových kultúrach, za prítomnosti detegovateľne značenej protilátky, schopnej identifikovať kódované proteíny; ďalej zahŕňajú detekciu protilátky jednou z mnohých techník, ktoré sú v danom odbore dobre známe.

(vii) Kódované proteíny podľa tohto vynálezu sa môžu použiť tiež ako nepriame modulátory mnohých z ďalších proteínov pre ich schopnosť väzby k ďalším intracelulárnym proteínom; uvedené ďalšie intracelulárne proteíny ešte priamo viažu ďalšie intracelulárne proteíny alebo intracelulárne domény transmembránových proteínov.

Na účely modulácie uvedených ďalších intracelulárných proteínov alebo intracelulárných domén transmembránových proteínov sa môžu proteíny podľa tohto vynálezu vložiť do buniek viacerými spôsobmi, ako sa uvádza v časti (ii).

Treba tiež poznamenať, že izolácia, identifikácia a charakterizácia proteínov podľa tohto vynálezu sa môže vykonať použitím ktoréhokoľvek zo známych bežných skríningových postupov. Jeden z týchto skríningových postupov je napríklad kvasinkový dvojhybridný postup, ktorý sa použil na identifikáciu proteínov podľa tohto vynálezu. Na izoláciu, identifikáciu a charakterizáciu proteínov podľa tohto vynálezu, alebo na izoláciu, identifikáciu a charakterizáciu ďalších proteínov, faktorov, receptorov a podobných, ktoré sú schopné sa viazať k proteínom podľa tohto vynálezu, môžu sa podobne použiť ďalšie postupy, ako je afinitná chromatografia, DNA hybridizačné postupy, a ďalšie, ako sú dobre známe v danom odbore.

Proteíny, pri ktorých sa zistilo, že sa viažu k proteínom podľa tohto vynálezu, sa navyše môžu samy použiť podobným spôsobom ako proteíny podľa tohto vynálezu, ako sa uviedlo a uvádza sa ďalej, na izoláciu, identifikáciu a charakterizáciu ďalších proteínov, faktorov a ďalších, ktoré sú schopné väzby k proteínom z tohto vynálezu; uvedené proteíny môžu predstavovať faktory zapojené ďalej v smere v združenom signálnom procese, alebo proteíny, ktoré môžu mať ich signálne aktivity, a preto predstavujú proteíny zapojené v určitom signálnom procese.

Uvedené sekvencie DNA a kódované proteíny podľa tohto vynálezu sa môžu pripraviť niektorým bežným rekombinantným DNA spôsobom (pozri napríklad Sambrook, et al., (1989)), v ktorom sa vhodné eukaryotické alebo prokaryotické bunky transformujú príslušnými eukaryotickými alebo prokaryotickými vektormi, obsahujúcimi sekvencie, kódujúce pre uvedené proteíny. Podľa uvedeného sa tento vynález týka tiež expresie vektorov a transformovaných hostiteľov na prípravu proteínov podľa tohto vynálezu. Ako už bolo uvedené, tieto proteíny zahŕňajú tiež ich biologicky aktívne analógy, fragmenty a ich deriváty a tak vektory, ktoré ich kódujú, tiež zahŕňajú vektory, kódujúce analógy a fragmenty týchto proteínov; transformovaní hostitelia zahŕňajú takých hostiteľov, ktorí produkujú uvedené analógy a fragmenty. Deriváty týchto proteínov sú deriváty, ktoré sú produkované bežnou modifikáciou proteínov alebo ich analógov, alebo fragmentov, produkovaných transformovaným hostiteľom.

Tento vynález sa týka tiež farmaceutických kompozícií na moduláciu účinkov sprostredkovaných s TRAF2. Farmaceutické kompozície obsahujú ako aktívnu zložku jednu alebo viac z nasledujúcich: (i) jednu alebo viac DNA sekvencií podľa tohto vynálezu, alebo ich častí, subklonované do vhodného expresného vektora; (ii) proteín podľa tohto vynálezu, jeho biologicky aktívne fragmenty, analógy, deriváty, alebo ich zmes; (iii) rekombinantný vektor živočíšneho vírusu, kódujúci pre proteín podľa tohto vynálezu, jeho biologicky aktívne fragmenty, analógy alebo jeho deriváty.

Uvedené farmaceutické kompozície sa použijú v závislosti od choroby, ktorú treba liečiť v množstvách prospešných pre pacienta, v závislosti od telesnej hmotnosti pacienta a od ďalších okolností, ako určí lekár.

Ako už bolo uvedené, jedno zo špecifických uskutočnení TRAF-väzbových proteínov podľa tohto vynálezu je TRAF2-väzbový proteín NIK. Vychádzajúc z poznatkov v zhode s týmto vynálezom, že NIK sa špecificky viaže k TRAF2 a sám o sebe je mediátorom/modulátorom TRAF2, potom NIK môže tak sprostredkovať/modulovať TRAF2-aktivitu pri aktivácii NF- κ B; preto jeho možná úloha v dráhe prežitia bunky je v tom, že TRAF2 pôsobí nezávisle, alebo v spojení s ďalšími proteínmi (napríklad s p55 TNF a p75 TNF receptormi, FAS/APO1 receptorom, MORT-1, RIP a TRADD), čo je dôležité pri navrhovaní liekov, ktoré môžu podľa požiadavky zvýšiť alebo potláčať interakcie medzi TRAF2 a NIK. Ak sa napríklad vyžaduje zvýšiť bunkovú cytotoxickosť, vyvolanú s TNF, bude treba inhibovať indukciu NF- κ B inhibíciou interakcie TRAF2 - NIK, alebo inhibíciou TRAF2 a/alebo NIK špecificky. Ak sa podobne vyžaduje napríklad inhibovať bunkovú cytotoxickosť vyvolanú s TNF, bude treba posilniť indukciu NF- κ B posilnením interakcie TRAF2 - NIK, alebo posilnením TRAF2- a/alebo NIK- špecifickej NF- κ B indukcie. V skutočnosti je veľa chorôb, pri ktorých uvedené liečiva môžu veľmi pomáhať. Medzi inými (pozri tiež diskusiu skôr) je to akútna hepatitída, pri ktorej sa usudzuje, že akútne poškodenie pečene sa zdá byť odrazom FAS/APO1 receptorom sprostredkovaného hynutia buniek pečene po indukcii Fas ligandom; ďalej, autoimunitne vyvolaná smrť buniek, ako je uhynutie β -Langerhansových buniek pankreasu, ktoré má za následok diabetes; hynutie buniek pri odmietaní štep (napríklad pri transplantácii obličky, srdca a pečene); hynutie oligodendrocytov mozgu pri skleróze multiplex; a AIDS-inhibovaná samovražda T buniek, čo spôsobuje proliferáciu vírusu AIDS a preto ochorenie AIDS.

V takých prípadoch sa bude vyžadovať, aby sa inhibovala dráha FAS/APO1 receptorovo sprostredkovanej bunkovej cytotoxickosti (apoptosis) a aby sa zosilnila FAS/APO1 receptorovo sprostredkovaná indukcia NF- κ B cez interakciu TRAF2 a TRAF2-NIK. Jeden spôsob, ako to dosiahnuť, je zvýšenie množstva NIK v bunkách, alebo zvýšenie množstva TRAF2 a NIK tak, že sa s NIK- alebo TRAF2-NIK-sprostredkovaná indukcia aktivácie NF- κ B zvýši, čím sa dosiahne vyššia úroveň aktivácie NF- κ B a tým aj prežitia buniek; alebo tak, že sa zvýši priama alebo nepriama interakcia medzi FAS/APO1 receptorom a TRAF2 (alebo TRAF2-NIK), čoho výsledkom je zníženie receptorových interakcií FAS/APO1 s bunkovými mediátormi cytotoxickosti (napríklad MACH, pozri schému na obr. 2b), čo má opäť za následok zvýšenie indukcie NF- κ B aktivácie a podporu prežitia buniek.

Naopak, v prípade nádorov a infikovaných buniek (pozri tiež diskusiu skôr), sa bude napríklad vyžadovať zvýšenie bunkovej cytotoxickosti sprostredkovanej receptorom FAS/APO1, aby sa zvýšilo hynutie buniek. V tomto prípade sa bude vyžadovať, aby sa inhibovali interakcie FAS/APO1 receptor - TRAF2 (alebo -TRAF2-NIK) a/alebo inhibícia priamo NIK, a tým sa znížila indukcia NF- κ B aktivity.

Je možné, aby NIK, alebo jedna, alebo viac jeho možných izoform, analógov alebo fragmentov mohli slúžiť ako „prirodzené“ inhibitory samotného NIK, alebo interakcie NIK-TRAF2, a tak slúžiť ako inhibitory indukcie NF- κ B aktivácie. Také inhibitory možno potom využiť ako špecifické inhibitory uvedené skôr, napríklad ako inhibitory, ak sa vyžaduje, na zvýšenie bunkových cytotoxických účinkov TNF alebo ligandu FAS/APO1 receptora, aby sa zvýšilo hynutie buniek. Ako sa na príklade v ďalšom texte uvádza, rôzne analógy a mutanty NIK sa skutočne izolovali v zhode s týmto vynálezom; sú to analógy/mutanty deficitné kinázy, ktoré sú schopné blokovat indukciu NF- κ B aktivácie, sprostredkovanej receptormi TNF, FAS/APO1 receptorom, s nimi združenými proteínmi TRAF, RIP a MORT1; ako aj sprostredkované s IL-1 receptorom (ktorého aktivácia je cez NIK, ale nezávislá od TRAF2); a tiež sprostredkované bakteriálnym toxínom (LPS), acetátom-myristátom forbolu a HLTV-1 proteínom TAX. Podobne sa skrínungu môžu podrobiť aj ďalšie látky, ako sú peptidy, organické zlúčeniny, protilátky a podobné tak, aby sa získali špecifické liečivá, ktoré sú schopné inhibície TRAF2-NIK interakcie alebo inhibície aktivity NIK.

Ak sa v rôznych situáciách vyžaduje zvýšenie aktivácie NF- κ B, ako sa uvádza, možno podobným spôsobom napríklad zvýšiť množstvo NIK a/alebo TRAF2 v bunkách rôznymi známymi postupmi, ako sa uvádzajú (napríklad vloženie DNA, kódujúcej NIK a/alebo TRAF2 do buniek, alebo akoukoľvek inou cestou, známou odborníkom v danej oblasti). Na výber špecifických liečiv, ktoré sú schopné zvyšovať aktivitu NIK alebo zvyšovať TRAF2-NIK interakcie, sa podobne môžu podrobiť skrínungu aj ďalšie látky, ako sú peptidy, organické zlúčeniny a podobné.

Ako sa môžu zostrojiť a podrobiť skrínungu peptidové inhibitory s NIK-TRAF2 interakciou uvádza príklad, ktorý však neobmedzuje rozsah tohto vynálezu, a ktorý je založený na skorších štúdiách peptidových inhibitorov ICE alebo ICE proteáz, substrátovej špecifickosti ICE a stratégiách epitopovej analýzy s použitím syntézy peptidu. Zistilo sa, že minimálna požiadavka pre účinné štiepenie peptidu s ICE je prítomnosť štyroch aminokyselín vľavo od štiepneho miesta s vysokou preferenciou aspartovej kyseliny v polohe P₁ a vpravo postačuje metylamín v polohe P₁ (Sleah et al., (1990); Howard et al., (1991); Thornberry et al., (1992)). Ďalej sa zistilo, že fluorogénny substrátový peptid (tetrapeptid), acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-metyl-kumaryl-7-amid), skrátené Ac-DEVD-AMC, zodpovedajúci sekvencii v poly-(ADP-ribóza)polymeráze (PARP), sa v bunkách krátko po stimulácii FAS-R štiepi (Kaufmann (1989); Kaufmann et al., (1993); Lazebnik et al., (1994)) a že je účinne štiepený s CPP32 (člen proteázovej skupiny CED3/ICE) a MACH proteázami.

Kedže Asp v polohe P₁ substrátu sa považuje za dôležitú, potom sa tetrapeptidy s Asp ako štvrtým aminokyselinovým zvyškom a rôzne kombinácie aminokyselín v polohách troch prvých zvyškov môžu rýchlo vytriediť podľa väzby k aktívnemu miestu použitej proteázy, napríklad spôsobom vyvinutým Geysenom (Geysen, (1985); Geysen et al., (1987)); uvedeným spôsobom sa na tuhom nosiči vykonal skrining značného počtu peptidov na špecifické interakcie s protilátkami. Väzba MACH proteáz k špecifickým peptidom sa môže detegovať celým radom známych detekčných spôsobov, známych odborníkom v danej oblasti, ako je rádioznačkovanie a podobné postupy. Tento Geysenov spôsob sa ukázal ako vhodný pri skúškach viac ako 4 000 peptidov v priebehu pracovného dňa.

Podobným spôsobom sa môže objasniť presná väzbová oblasť alebo homológna oblasť, ktorá určuje uvedenú interakciu medzi TRAF2 a NIK (alebo ktorýmkoľvek iným TRAF proteínom a TRAF-väzbovým proteínom); polypeptidy sa potom môžu podrobiť skriningu, ktorý môže slúžiť na blokovanie tejto interakcie napríklad pri syntetizovaných peptidoch, ktoré majú podobné sekvencie, ako sú sekvencie väzbovej oblasti, alebo sekvencie k nim komplementárne a tým môžu súťažiť (konkurovať) s prírodným NIK (alebo TRAF-väzbovým proteínom) pri viazaní k TRAF2 (alebo TRAF).

Preto môže byť výhodné konštruovať peptidové inhibítory, ktoré selektívne inhibujú TRAF2-NIK (alebo TRAF-TRAF väzbový proteín) interakcie bez interferencie s fyziologickými procesmi hynutia buniek, v ktorých sú zapojení iní účastníci intracelulárnej signálnej dráhy, napríklad MACH proteázy dráhy hynutia buniek, ktoré sú členmi skupiny CED3/ICE proteáz zo zoskupenia peptidov viažucich sa k TRAF2 (alebo k TRAF), alebo NIK (alebo TRAF-väzbové proteíny); pri skúškach, ako sú opísané, môžu byť peptidové inhibítory ďalej syntetizované na skúšku selektívnej väzby k uvedeným ďalším proteínom ako fluorogénny substrát s cieľom výberu iba takých proteínov, ktoré sú špecifické pre TRAF2/NIK (alebo TRAF/TRAF-väzbový proteín). Peptidy, pri ktorých sa dokázalo, že sú špecifické napríklad pre TRAF2/NIK, sa na posilnenie bunkovej permeability a inhibíciu uvedenej aktivity TRAF2 a/alebo NIK, potom môžu alebo vratne, alebo nevratne modifikovať. Thornberry et al., (1994) uviedol, že tetrapeptid (acyloxy)metylketón Ac-Tyr-Val-

-Ala-Asp-CH₂OC(O)-[2,6-(CF₃)₂]Ph bol silným inaktívačom ICE. Podobne Milligan et al., (1995) uviedol, že tetrapeptidové inhibítory, ktoré majú chlórmetylketónové (nevratne) alebo aldehydové (vratne) skupiny inhibovali ICE. Navyše sa ukázalo, že benzyloxykarboxyl-Asp-CH₂OC(O)-2,6-dichlórbenzén (DCB) tiež inhibuje ICE (Mashima et al., (1995)). Obdobným spôsobom a v zhode s už uvedeným sa tetrapeptidy, ktoré sa selektívne viažu k napríklad TRAF2 alebo NIK sa môžu modifikovať napríklad aldehydovou skupinou, chlórmetylketónovou, (acyloxy)metylketónovou, alebo CH₂OC(O)-DCB skupinou, čím sa vznikne peptidový inhibítor TRAF2/NIK aktivity. Na zlepšenie permeability sa peptidy ďalej môžu modifikovať, napríklad chemicky, alebo sa na zvýšenie permeability cez bunkovú membránu a uľahčenie transportu uvedených peptidov cez membránu a do cytoplazmy môžu pripraviť ich deriváty. Muranishi et al., (1991) uvádza derivatizáciu tyrotropín uvoľňujúceho hormónu s laurylovou kyselinou za vzniku lipofilného lauroyl-derivátu s dobrými penetračnými vlastnosťami cez bunkovú membránu. Zacharia et al., (1991) uvádza, že oxidácia metionínu na sulfoxid a náhrada peptidovej väzby s jeho ketometylénovým izoesterom (COCH₂) tiež uľahčuje transport peptidu cez bunkovú membránu. To sú iba niektoré zo známych modifikácií a príkladov derivátov, ktoré sú dobre známe odborníkom v danej oblasti.

Pri liečive alebo peptidových inhibítoroch, ktoré sú schopné inhibovať aktivitu napríklad NIK inhibíciou NIK-TRAF2 interakcie, a podobných, možno interakciu medzi TRAF proteínmi a TRAF-väzbovými proteínmi ďalej uľahčovať spájaním alebo tvorbou komplexov s molekulami, ktoré podporujú vnikanie do bunky.

Patent USA 5 149 782 zverejňuje spojenie molekuly, ktorá sa má transportovať bunkovou membránou s činidlom, ktoré splyva s membránou, ako sú fúzogenné peptidy, peptidy vytvárajúce iónové kanály, iné membránové polypeptidy a mastné kyseliny s dlhým reťazcom, napríklad kyselina myristová, kyselina palmitová. Uvedené činidlá vložia molekulové konjugáty do lipidovej dvojvrstvy bunkových membrán a uľahčujú ich vniknutie do cytoplazmy.

Low et al., v patente USA 5 108 921 podáva prehľad vhodných spôsobov na transmembránový prísun molekúl, ako sú, ale nie iba, proteíny a nukleové kyseliny, mechanizmom receptorom sprostredkovanej endocytotickej aktivity. Tieto receptorové systémy zahŕňajú také receptorové systémy, ktoré rozpoznávajú galaktózu, manózu, 6-fosfát manózy, transferín, asialoglykoproteín, transkobalamín (vitamín B₁₂), α-2 makroglobulín, inzulin a ďalšie peptidové rastové faktory, ako je epidermálny rastový faktor (EGF). Low et al., usudzuje, že výživné receptory, ako sú receptory pre biotín a folát sa môžu výhodne použiť na podporu transportu bunkovou membránou, pretože majú vhodné rozmiestnenie a početnosť biotínových a folátových receptorov na povrchoch membrán väčšiny buniek a na podporu združenými receptormi sprostredkovaných membránových transportných procesov. Komplex, vytvorený medzi zlúčeninou, ktorá sa má dopraviť do cytoplazmy a ligandom, ako je biotín alebo folát, prichádza tak do styku s membránou bunky, ktorá obsahuje biotínové a folátové receptory na iniciáciu receptorom sprostredkovaného transmembránového transportného mechanizmu, čím sa umožňuje prísun vyžadovanej zlúčeniny do bunky.

ICE je známy tým, že má schopnosť tolerovať liberálne substitúcie v polohe P₂ a táto tolerancia k liberálnym substitúciám sa využila na vývoj účinnej a afinitnej značky s vysokou selektivitou, obsahujúcej biotínové zakončenie (Thornberry et al., (1994)). V dôsledku toho na zvýšenie permeability týchto peptidových inhibítorov bunkovou membránou môže byť poloha P₂, možno aj N-zakončenie tetrapeptidového inhibítora modifikované alebo derivatizované, napríklad pridaním biotínovej molekuly.

Ďalej je v odbore známe, že fúzia vyžadovanej peptidovej sekvencie s hlavnou/signálnou peptidovou sekvenciou vytvorením „chimérového peptidu“ umožní, aby sa uvedený „chimérový peptid“ transportoval cez bunkovú membránu do cytoplazmy.

Ako sa uznáva odborníkmi v oblasti peptidov, pod peptidovými inhibítormi interakcie TRAF-TRAFvázbový proteín, napríklad interakcie TRAF2-NIK podľa tohto vynálezu sa rozumie, že zahŕňajú peptidomimetické liečiva alebo inhibítory, ktoré sa môžu tiež skríningom rýchlo vytriediť, napríklad podľa väzby k TRAF2/NIK, s cieľom konštrukcie možno ešte stabilnejších inhibítorov.

Je vítané, že rovnaké prostriedky na uľahčenie alebo posilnenie transportu peptidových inhibítorov bunkovými membránami, ako boli použité, možno rovnako použiť aj pre TRAF-vázbové proteíny, napríklad pre NIK, jeho analógy, fragmenty, alebo jeho izoformy samotné, ako aj pre ďalšie peptidy a proteíny, ktoré svoje účinky prejavujú v vnútri buniek.

Pokiaľ sa týka výrazu protilátka, používaného v tomto texte, výraz „protilátka“ sa chápe tak, že zahŕňa polyklonové protilátky, monoklonové protilátky (mAbs), chimérové protilátky, anti-idiotypové (anti-Id) protilátky k protilátkam, ktoré môžu byť značené v rozpustnej alebo viazanej forme, ako aj ich fragmenty, pripravené ktoroukoľvek známou technikou, ako napríklad je, ale nie iba, enzymatické štiepenie, peptidová syntéza alebo rekombinantné techniky.

Polyklonové protilátky sú heterogénne populácie protilátkových molekúl, odvodených zo séra živočíchov imunizovaných antigénom. Monoklonové protilátky obsahujú v podstate homogénnu populáciu protilátok, špecifických k antigénom, ktorých populácie obsahujú v podstate podobné epitopové väzbové miesta. Monoklonové protilátky sa môžu pripraviť spôsobmi, známymi odborníkom v danej oblasti. Pozri napríklad Kohler a Milstein, Nature 256, 495 až 497 (1975); patent USA 4 376 110; Ausubel et al., Eds. Harlow a Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., Eds., Current Protocol of Immunology, Green Publishing Association, a Wiley Interscience NY, (1992 až 1996); obsah týchto publikácií sa tu v celosti zahŕňa týmto odkazom. Uvedené protilátky môžu pochádzať z ktorejkoľvek imunoglobulínovej skupiny vrátane IgG, IgM, IgE, IgA, GILD a z ktorejkoľvek ich podskupiny. Hybridómy, produkujúce mAbs z tohto vynálezu, sa môžu kultivovať *in vitro* alebo *in vivo*. Produkcia vysokých titrov monoklonových protilátok *in vivo* alebo *in vitro* je súčasne výhodným spôsobom produkcie podľa tohto vynálezu.

Chimérové protilátky sú molekuly, ktorých rôzne časti sú odvodené z rôznych živočíšnych druhov, ako sú napríklad protilátky s vymeniteľnou oblasťou, odvodenou z protilátky myši a so stálou oblasťou z ľudského imunoglobulínu. Chimérové protilátky sú používané primárne na znižovanie imunogenicity pri použití protilátok a na zvýšenie výťažkov v produkcii, napríklad sa používajú chimérové ľudské/myšacie monoklonové protilátky (mAbs) vtedy, keď monoklonové protilátky myši dávajú vyššie výťažky z hybridómov, ale vyššiu imunogenitu u ľudí. Chimérové protilátky a spôsoby ich produkcie sú v odbore známe (Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3273 až 3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 až 6855 (1984); Bouliane et al., Nature 312, 643 až 646 (1984); Cabilly et al., prihláška Európskeho patentu 125 023 (zverejnená 14. novembra 1984); Neuberger et al., Nature 314, 268 až 270 (1985); Taniguchi et al., prihláška Európskeho patentu 171 496 (zverejnená 19. februára 1985); Morrison et al., prihláška Európskeho patentu 173 494 (zverejnená 5. marca 1986); Neuberger et al., PCT prihláška WO 8 601 533 (zverejnená 13. marca 1986); Kudo et al., prihláška Európskeho patentu 184 187 (zverejnená 11. júna 1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066 až 1074 (1986); Robinson et al. prihláška medzinárodného patentu WO 8 702 671 (zverejnená 7. mája 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3439 až 3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 214 až 218 (1987); Better et al., Science 240, 1041 až 1043 (1988); a Harlow a Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, uvedený už hore). Uvedené spisy sa v celosti zahŕňajú v tomto vynáleze odkazom.

Uvedená anti-idiotypová (anti-Id) protilátka je protilátka, ktorá rozpoznáva špecifické determinanty všeobecne združené s antigénovým väzbovým miestom protilátky. Id protilátka sa môže pripraviť imunizáciou živočicha rovnakého druhu a genetického typu (napríklad z kmeňa myši) ako zdroja mAb, ku ktorej sa anti-Id pripravuje. Imunizovaný živočích potom rozpoznáva a poskytuje reakciu na idiotypové determinanty imunizujúcej protilátky produkciou protilátky k týmto idiotypovým determinantom (uvedená anti-Id-protilátka). Pozri napríklad patent USA 4 699 880, ktorý sa v celosti zahŕňa týmto odkazom.

Uvedená Id-protilátka sa môže použiť tiež ako „imunogén“ na indukciu imunitnej odpovede ešte u iných živočíchov, produkujúcich takzvanú ant-anti-Id protilátku. Uvedená anti-anti-Id môže byť epitopicky indetická s pôvodnou mAb, ktorá indukuje uvedenú anti-Id. Použitím týchto protilátok k idiotypovým determi-

nantom monoklonových protilátok je potom možné identifikovať ďalšie klony, exprimujúce protilátky so zhodnou špecifickosťou.

Monoklonové protilátky, generované proti TRAF-väzbovým proteínom, analógom, fragmentom, alebo ich derivátom (napríklad NIK, jeho izoformám, analógom, fragmentom alebo jeho derivátom) z tohto vynálezu, môžu sa v zhode s doteraz uvedeným použiť na indukciu anti-Id protilátok vo vhodných živočíchoch, ako sú napríklad BALB/c myši. Na produkciu anti-Id hybridom, vylučujúcich anti-Id, sa použijú slezinové bunky uvedených imunizovaných myší. Ďalej, anti-Id protilátky sa môžu viazať s nosičom, ako je napríklad prísavný hemokyanín („keyhole limpet hemocyanin“, KLH) a použiť na imunizáciu ďalších BALB/c myší. Séra týchto myší budú obsahovať anti-anti-Id protilátky, ktoré majú väzbové vlastnosti pôvodnej monoklonovej protilátky, špecifickej k epitopu uvedeného TRAF-väzbového proteínu, alebo jeho analógov, fragmentov a ich derivátov.

Uvedené anti-Id monoklonové protilátky majú im vlastné idiotypové epitopy, „idiotypy“, štruktúrne podobné hodnoteným epitopom, ako je napríklad GRB proteín-a.

Do výrazu „protilátka“ sa tiež zahŕňajú intaktné molekuly, ako aj ich fragmenty, ako sú napríklad Fab a $F(ab')_2$, ktoré sú schopné viazať antigén. Fragmenty Fab a $F(ab')_2$ s nedostatočným fragmentom Fc intaktnej molekuly sa pri cirkulácii rýchlejšie čistia a môžu mať menej nešpecifických tkanivových väzieb ako intaktná protilátka (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24, 316 až 325 (1983)).

Bude výhodné, ak sa Fab a $F(ab')_2$ a ďalšie fragmenty protilátok, užitočných podľa tohto vynálezu použijú na detekciu a kvantifikáciu TRAF-väzbového proteínu spôsobmi pre intaktné protilátkové molekuly, objasnenými skôr. Také fragmenty sú typicky produkované proteolytickým štiepením s použitím enzýmov, ako je napríklad papaín (na produkciu fragmentov Fab) alebo pepsín (na produkciu fragmentov $F(ab')_2$).

Ak sa uvádza, že protilátka „je schopná väzby“ molekuly, znamená to, že je schopná špecificky reagovať s uvedenou molekulou, čím sa molekula viaže k protilátke. Výraz „epitop“ sa vzťahuje na takú časť akejkoľvek molekuly, schopnej sa viazať protilátkou, ktorá môže byť uvedenou protilátkou rozpoznávaná. Epitopy, „antigénové determinanty“ zvyčajne pozostávajú z chemicky aktívnych povrchových zoskupení molekúl, ako sú aminokyseliny alebo vedľajšie reťazce sacharidov a majú špecifický trojrozmerný štruktúrny charakter, ako aj špecifický nábojový charakter.

„Antigén“ je molekula alebo časť molekuly, ktorá je schopná, aby bola viazaná protilátkou, ktorá je ďalej schopná indukovať živočícha, aby produkoval protilátku, schopnú väzby k epitopu uvedeného antigénu. Antigén môže mať jeden alebo viac epitopov. Uvedený výraz špecifická reakcia znamená, že antigén bude reagovať vysoko selektívnym spôsobom s jemu zodpovedajúcou protilátkou a nie s mnohými inými protilátkami, ktoré môžu byť vyvolané inými antigénmi.

Uvedené protilátky vrátane fragmentov protilátok, užitočné podľa tohto vynálezu, sa môžu použiť na kvantitatívne stanovenie alebo kvalitatívny dôkaz TRAF-väzbového proteínu (napríklad NIK) vo vzorke, alebo na dôkaz prítomnosti buniek, ktoré exprimujú TRAF-väzbový proteín podľa tohto vynálezu. Dôkazy alebo stanovenia sa môžu vykonať imunofluorescenčnými technikami s využitím fluorescenčne značených protilátok (pozri v ďalšom texte) v spojení so svetelnou mikroskópiou, prietokovou cytometriou alebo fluorometrickou detekciou.

Uvedené protilátky (alebo ich fragmenty), užitočné podľa tohto vynálezu, sa môžu využiť histologicky, napríklad v imunofluorescenčnej alebo elektrónovej mikroskópii, na *in situ* detekciu TRAF-väzbového proteínu podľa tohto vynálezu. Detekcia *in situ* sa môže vykonať odberom histologických vzoriek od pacienta, a pridaním značenej protilátky podľa tohto vynálezu k uvedenej vzorke. Protilátka (alebo jej fragment) sa výhodne pridá náterom alebo prevrstvením biologickej vzorky značenou protilátkou (alebo jej fragmentom). Použitím uvedeného postupu možno stanoviť nielen prítomnosť TRAF-väzbového proteínu, ale tiež jeho rozdelenie v skúšanom tkanive. Pri použití tohto vynálezu si môžu bežne skúsení v tejto oblasti uvedomiť, že ktorúkoľvek z množstva rôznych histologických metód (ako sú napríklad farbiace postupy) možno modifikovať tak, aby sa dosiahla detekcia *in situ*.

Skúšobné postupy na dôkaz a/alebo stanovenie TRAF-väzbového proteínu podľa tohto vynálezu typicky zahŕňajú inkubáciu biologickej vzorky, napríklad biologickej tekutiny, tkanivového extraktu, čerstvo vypestovaných buniek, ako sú lymfocyty alebo leukocyty, alebo buniek po kultivácii v tkanivovej kultúre, za prítomnosti dokázateľného množstva značenej protilátky, schopnej identifikovať uvedený TRAF-väzbový proteín, a ďalej zahŕňajú detekciu protilátky niektorou z mnohých techník, známych v danom odbore.

Biologická vzorka sa môže spracovávať na tuhej podložke alebo na nosiči, ako je nitrocelulóza, alebo na iných tuhých podložkách alebo nosičoch, ktoré sú schopné imobilizovať bunky, časti buniek, alebo rozpustné proteíny. Podložka alebo nosič sa potom môže premývať vhodným tlmivým roztokom a následne spracovaním s detegovateľne značenou protilátkou v zhode s týmto vynálezom, ako sa uvádza skôr. Tuhá podložka alebo nosič sa potom môže premyť druhý raz s tlmivým roztokom na odstránenie neviazanej protilátky. Množstvo viazanej značky na uvedenej podložke alebo nosiči sa potom stanoví bežnými spôsobmi.

Výrazmi „tuhá podložka“, „tuhý nosič“, „podložka“, alebo „nosič“ sa rozumie akákoľvek podložka alebo nosič, schopný viazať antigén alebo protilátku. Všeobecne známe podložky alebo nosiče zahŕňajú napríklad

sklo, polystyrén, polypropylén, polyetylén, dextrans, amylázový nylon, prírodné a modifikované celulózy, polyakrylamidy, gabra a magnetit. Na účely tohto vynálezu môže byť povaha nosiča taká, že nosič je čiastočne rozpustný alebo nerozpustný. Materiál podložky môže mať prakticky akúkoľvek možnú štruktúrnú konfiguráciu, pokiaľ je viazaná molekula schopná viazať sa k antigénu alebo k protilátke. Konfigurácia podložky alebo nosiča môže byť potom sférická, ako sú perličky, valcová, ako je vnútorný povrch skúšobných rúrok, alebo vonkajší povrch tyče. Voliteľne môže byť povrch plochý, ako sú listy, skúšobné pružky a podobne. Výhodné podložky alebo nosiče zahŕňajú polystyrénové perličky. Na viazanie protilátky alebo antigénu odborníci v danej oblasti poznajú ešte ďalšie vhodné nosiče, alebo sú ich schopní zistiť bežným experimentovaním.

Väzbovú aktivitu danej dávky protilátky podľa tohto vynálezu, ako je uvedené, možno stanoviť všeobecne známymi spôsobmi. Skúsení v danom odbore sú schopní pomocou bežných experimentov určiť pracovné a optimálne podmienky pre každé stanovenie.

Do postupu skúšky sa môžu v jednotlivých situáciách zahrnúť ďalšie experimentálne kroky, ako je premývanie, miešanie, trepanie, filtrovanie a podobné, ak sú uvedené kroky zaužívané alebo potrebné.

Jedným zo spôsobov, ktorým sa môže protilátka v zhode s týmto vynálezom detegovateľne značiť, je viazanie uvedenej protilátky s enzýmom a použitie v enzýmovej imunoanalýze (EIA). Ak je tento enzým potom exponovaný vhodným substrátom, reaguje s týmto substrátom takým spôsobom, že produkuje chemické zoskupenie, ktoré sa môže detegovať, napríklad spektrofotometricky, fluorometricky, alebo vizuálnym porovnávaním. Na detegovateľné označenie protilátky enzýmami možno použiť napríklad, ale nie iba, malonátovú dehydrogenázu, stafylokokovú nukleázu, delta-5-steroidovú izomerázu, alkoholovú dehydrogenázu kvasiniek, alfa-glycerofosfátovú dehydrogenázu, triózovú fosfátovú izomerázu, chrenovú peroxidázu, alkalickú fosfatázu, asparaginázu, glukózovú oxidázu, beta-galaktózidázu, ribonukleázu, areázu, katalázu, glukózovú-6-fosfátovú dehydrogenázu, glukamylázu a acetylcholinovú esterázu. Detekcia sa môže vykonať kolorimetrickými spôsobmi s použitím chrómogénneho substrátu pre enzým. Detekcia sa môže vykonať tiež vizuálnym porovnávaním rozsahu enzymatickej reakcie v substráte v porovnaní s obdobne pripravenými štandardmi.

Detekcia sa môže vykonať použitím ktorejkoľvek z rôznych ďalších imunoanalýz. Napríklad, rádioaktívnym značením protilátok alebo fragmentov protilátok možno detegovať R-PTP-ázy použitím rádioimunoanalýzy (RIA). Dobrý opis spôsobu RIA možno nájsť v *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology* (Work, T. S. et al., North Publishing Company, NY (1978)) s osobitným odkazom na kapitolu, nazvanú „An introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques“ od autora Chard, T., ktorá sa tu zahŕňa týmto odkazom. Rádioaktívne izotopy sa môžu detegovať použitím g-čítača alebo scintilačného čítača, alebo autorádiografiou.

Protilátku možno podľa tohto vynálezu tiež značiť fluorescenčnou zlúčeninou. Keď sa fluorescenčne značená zlúčenina vystaví účinku svetla s vhodnou vlnovou dĺžkou, jej prítomnosť sa prejaví fluorescenciou. Medzi najviac používané fluorescenčne značujúce zlúčeniny patrí izotiokyanát, rodamín, fykoerytrín, pykocyánin, alofokocyánin, o-ftaldehyd a fluorescamín.

Protilátka sa môže detegovateľne označiť tiež použitím fluorescenciu vyžarujúcich kovov, ako je napríklad ^{152}E , alebo ďalších zo skupiny lantanidov. Tieto kovy možno viazať k protilátke s využitím skupín, ktoré uvedený kov viažu vo forme chelátu, ako je napríklad dietyléntriáminpentaoctová kyselina (ETPA).

Protilátka sa môže detegovateľne označiť tiež jej spojením s chemoluminiscenčnou zlúčeninou. Prítomnosť chemoluminiscenčne značenej protilátky sa potom prejaví prítomnosťou luminiscencie, ktorá vzniká v priebehu chemickej reakcie.

Príklady výhodných chemoluminiscenčne značujúcich zlúčenín sú luminol, izoluminol, akridíniový ester, imidazol, akridíniová soľ a ester kyseliny oxálovej.

Podobne sa na značenie protilátky podľa tohto vynálezu môže použiť bioluminiscenčná zlúčenina. Bioluminiscencia je druh chemoluminiscencie, zisťovanej v biologických systémoch, v ktorých katalytický proteín zvyšuje účinnosť chemoluminiscenčnej reakcie. Prítomnosť bioluminiscenčného proteínu sa stanoví detekciou prítomnosti luminiscencie. Dôležité bioluminiscenčné zlúčeniny, vhodné na tento účel sú luciferín, luciferáza a ekvorín.

Molekula protilátky podľa tohto vynálezu sa môže prispôsobiť na použitie v imunometrickej analýze, známej tiež ako „dvojmiestna“ alebo „sendvičová“ analýza. Pri typickej imunometrickej analýze sa známe množstvo neznačenej protilátky (alebo fragmentu protilátky) viaže na tuhú podložku alebo nosič a potom sa pridá detegovateľne značená rozpustná protilátka; vzniká ternárny komplex medzi touhou fázou s protilátkou, antigénom a značenou protilátkou, ktorý umožňuje detekciu a/alebo kvantitatívne stanovenie.

Typické a výhodné imunometrické analýzy zahŕňajú „vpred“ analýzy, pri ktorých sa protilátka, viazaná na tuhej fáze najprv privádza do styku so skúšanou vzorkou, aby sa extrahoval antigén zo vzorky, vzniknutý vo forme binárneho komplexu tuhej fázy s protilátkou a antigénom. Po vhodnej dobe inkubácie sa tuhá podložka alebo nosič premyje na odstránenie zvyškov tekutej vzorky vrátane nezreagovaného antigénu, ak by bol prítomný, a potom sa privedie do styku s roztokom, obsahujúcim neznáme množstvo značenej protilátky

(ktorá pôsobí ako „spravodajská molekula“, reporter molecule). Po niekoľkosekundovej dobe inkubácie, počas ktorej sa značená protilátka viaže do komplexu s antigénom viazaným na tuhej podložke alebo nosiči cez neznačenú protilátku sa tuhá podložka alebo nosič sa premyje po druhý raz, aby sa odstránila nezreagovaná značená protilátka.

V inej úprave sa „sendvičový“ postup môže tiež použiť v súvislosti s antigénmi podľa tohto vynálezu ako tak zvané „simultánne“ a „vratné“ („reverzné“) imunoanalýzy. Simultánna analýza vyžaduje jeden inkubačný krok, pretože sa obidva, protilátka na tuhej podložke alebo nosiči a značená protilátka súčasne pridávajú do skúšanej vzorky. Po ukončení inkubácie sa tuhá podložka alebo nosič premyje na odstránenie zvyšku tekutej vzorky a značenej protilátky, ktorá sa neviazala do komplexu. Prítomnosť značenej protilátky, viazanej na tuhej podložke alebo nosiči sa potom stanoví ako pri už uvedenej „vpred“ analýze sendvičového spôsobu.

Vo „vratnom“ uskutočnení analýzy sa najprv postupne pridá roztok značenej protilátky k roztoku vzorky, potom, po vhodnej dobe inkubácie, nasleduje pridanie neznačenej protilátky, viazanej na tuhej podložke alebo nosiči. Po druhej inkubácii sa tuhá fáza bežným spôsobom premyje, aby sa zbavila zvyšku skúšanej vzorky a roztoku nezreagovanej značenej protilátky. Stanovenie značenej protilátky, viazanej na tuhej podložke alebo nosiči sa potom vykoná rovnako ako v prípadoch „simultánnej“ alebo „vpred“ analýzy.

Ako už bolo uvedené, vynález sa týka tiež farmaceutických kompozícií, obsahujúcich rekombinantné živočíšne vírusové vektory, kódujúce TRAF-väzbové proteíny, ktoré kódujú tiež vírusový povrchový proteín, schopný viazať špecifické povrchové proteíny terčových buniek (napríklad rakovinových) za usmernenia inzercie TRAF-väzbových proteínových sekvencií do buniek. Ďalšie farmaceutické kompozície podľa tohto vynálezu obsahujú ako aktívnu zložku (a) oligonukleotidovú sekvenciu, kódujúcu protismernú sekvenciu TRAF-väzbovej proteínovej sekvencie, alebo (b) liečivo, ktoré blokuje interakciu medzi TRAF-väzbovým proteínom a TRAF.

Farmaceutické kompozície podľa tohto vynálezu obsahujú dostatočné množstvo aktívnej zložky na dosiahnutie zamýšľaného účinku. Farmaceutické kompozície ďalej môžu obsahovať vhodné, farmaceuticky prípustné nosiče, obsahujúce farmaceutické pomocné látky a prísady, ktoré uľahčujú spracovanie aktívnej zlúčeniny na liečivé prípravky, ktoré sa môžu farmaceuticky použiť, a ktoré môžu stabilizovať liečivé prípravky v liekových formách na podávanie subjektu, ktorý to potrebuje, čo všetko je dobre známe odborníkom v danej oblasti.

Usudzuje sa, že uvedený TRAF-väzbový proteín a jeho izoformy alebo izotypy sú exprimované v rôznych tkanivách a na významne rozdielnej úrovni a zrejme tiež v rôznom zastúpení izotypov obdobným spôsobom, ako prebieha expresia rôznych iných proteínov, zapojených do intracelulárnych signálnych dráh, ako je uvedené v citovanej, spoločne vlastnenej, prihláške závislého patentu.

Uvedené rozdiely môžu prispievať k tkanivovo-špecifickým javom reakcie na FAS/APO1-ligand a TNF. Podobne, ako v prípade ďalších homológov od CED3/ICE (Wang et al., (1994); Alnemri et al., (1995)), autori tohto vynálezu už v minulosti ukázali (v uvedenej patentovej prihláške), že izoformy MACH, ktoré obsahujú neúplné oblasti CED3/ICE (napríklad MACH α 3) majú inhibičný účinok na aktivitu ko-exprimovaných MACH α 1 alebo MACH α 2 molekúl; tiež sa zistilo, že blokujú FAS/APO1 a p55-R indukciu hynutia buniek. Expresia takých inhibičných izoform v bunkách môže vytvárať mechanizmus samoochrany bunky proti FAS/APO1- a TNF - sprostredkovanej cytotoxickosti. Rozsiahla heterogenita izoform MACH, ktorá značne presahuje doteraz pozorované heterogenity pri ktorýchkoľvek ďalších proteázach skupiny CED3/ICE by mohla umožňovať mimoriadne citlivo nastavovať funkcie aktívnych izoform MACH.

V zhode s týmto vynálezom sa izolovali tiež analógy/mutanty jedného z TRAF-väzbových proteínov, menovite TRAF2-väzbového proteínu NIK. Tieto analógy /mutanty NIK (pozri hore a pozri Príklad, uvedený ďalej) sú inhibičné k NIK-sprostredkovanej, ako aj inhibičné k indukcii aktivácie NF- κ B, sprostredkovanej TNF receptormi, FAS/APO1 receptorom, jemu príbuznými proteínmi, IL-1 receptorom a ďalšími činidlami. Ako už bolo spomenuté, môžu preto mať TRAF-väzbové proteíny, alebo ich možné izoformy odlišné účinky v rôznych tkanivách, pokiaľ sa týka ich interakcie s TRAF proteínmi a ich vplyvu a tým na aktivitu TRAF proteínov, alebo na intracelulárnu signalizáciu, sprostredkovanú proteínmi.

Tiež je možné, že niektoré z možných izoform MACH-väzbového proteínu majú aj iné funkcie. NIK, alebo niektoré analógy NIK môžu napríklad pôsobiť tiež ako kotviace miesta pre molekuly, ktoré sú zapojené do iných ako cytotoxických účinkov, napríklad do účinkov receptorov FAS/APO1 a TNF cez interakciu s TRAF2 alebo aj nezávisle od TRAF2.

V dôsledku jedinečnej schopnosti receptorov FAS/APO1 a TNF spôsobovať hynutie buniek, ako aj schopnosti receptorov TNF spúšťať ďalšie aktivity poškodzujúce tkanivá, odchýlky vo funkcii týchto receptorov môžu byť pre organizmus mimoriadne škodlivé. Skutočne sa ukázalo, že nadmerná alebo nedostatočná funkcia týchto receptorov prispieva k patologickým prejavom rôznych chorôb (Vassalli (1992); Nagata a Golstein (1995)). Identifikácia molekúl, ktoré sa zúčastňujú na signálnej aktivite uvedených receptorov a nájdenie cesty, ako modulovať aktivitu týchto molekúl môže určiť smer nových terapeutických prístupov. Z hľadiska možnej dôležitej úlohy TRAF proteínov, napríklad proteínov TRAF2, a preto interakcií TRAF-TRAF-väzbového proteínu, napríklad TRAF2-NIK proteínu v FAS/APO1 a TNF-sprostredkovanej aktivá-

cii, zdá sa byť mimoriadne dôležité navrhnúť liečivá, ktoré môžu blokovat' interakciu TRAF-TRAF väzbový proteín, napríklad interakciu TRAF2-NIK, ak sa vyžaduje ničit' bunky (inhibíciou aktivácie NF- κ B) a obrátenie, ak sa vyžaduje zachovať bunky, túto interakciu treba podporit' (zosilnit' aktiváciu NF- κ B).

5 Tento vynález sa tiež týka proteínov alebo iných ligandov, ktoré sa môžu viazať k TRAF-väzbovým proteínom podľa tohto vynálezu, čím modulujú/-sprostredkujú aktivitu TRAF-väzbových proteínov. Uvedené proteíny alebo ligandy sa môžu vytriediť skríningom, izolovať a produkovať ktorýmkoľvek z už uvedených spôsobov. Možno tak napríklad izolovať mnohé nové ligandy, obsahujúce proteíny, schopné väzby k proteínom NIK z tohto vynálezu (uvedené nové proteíny/ligandy s výnimkou známeho TRAF2 a možno I- κ B, ak sa NIK skutočne viaže s I- κ B).

10 Podrobnejšie už bolo uvedené hore, že nové TRAF-väzbové proteín-väzbové proteíny/ligandy, napríklad NIK-väzbové proteíny môžu napríklad slúžiť ako inhibítory alebo enhancery (posilňujúce sekvencie, zosilňovače) NIK sprostredkovanej aktivity, alebo aktivity sprostredkovanej napríklad TRAF2 - NIK interakciou; potom majú dôležitú úlohu v rôznych patologických a iných situáciách, ako sa už uviedlo. Inou funkciou uvedených zoskupení TRAF-väzbový proteín-väzbové proteíny/ligandy by mohlo byť, že by slúžili ako špecifické činidlá na čistenie TRAF-väzbových proteínov, napríklad afinitnou chromatografiou; uvedené nové väzbové proteíny/ligandy zakotvené na vhodnej chromatografickej matici vytvárajú tuhú alebo afinitnú podložku alebo maticu, cez ktorú sa prelieva roztok, extrakt alebo podobná forma, obsahujúca uvedené TRAF-väzbové proteíny, napríklad NIK a týmto spôsobom sa uľahčí jeho čistenie. Uvedené spôsoby afinitnej chromatografie sú už všeobecne známe a patria k bežným postupom v danom odbore.

20 Všetky z uvádzaných TRAF-väzbových proteínov, analógov, fragmentov, izoforiem a derivátov podľa tohto vynálezu sa podobne môžu použiť na čistenie afinitnou chromatografiou rôznych TRAF proteínov, ku ktorým sa viažu. Napríklad, TRAF2-väzbové proteíny, ako je NIK, a analógy, fragmenty a mutanty NIK (pozri ďalej uvedené príklady) sa môžu použiť pri čistení TRAF2 pomocou afinitnej chromatografie. Rovnakým spôsobom, ako proteín NIK sa preto izolovali analógy/mutanty z tohto vynálezu a produkovali (pozri ďalej uvedené príklady) s použitím uvedených a akýchkoľvek ďalších rovnocenných spôsobov, ktoré sú zrejmé odborníkom v danej oblasti (podrobnejšie rozvedené skôr). Uvedeným spôsobom možno identifikovať a produkovať akékoľvek iné TRAF2-väzbové proteíny. Uvedený spôsob identifikácie a produkcie týchto TRAF-väzbových proteínov, napríklad TRAF2-väzbových proteínov zahŕňa skríning, pri ktorom ktorom sa použije TRAF (napríklad TRAF2) proteín, alebo pri najmenšom jeho špecifická časť (to znamená časť 30 TRAF2 medzi aminokyselinami od 222 až po 501) ako substrát alebo „návnada“, aby sa získali proteíny alebo akýkoľvek iný ligand, schopné väzby k TRAF proteínu; nasledujú kroky identifikácia a charakterizácia tak získaných proteínov/ligandov a následne produkcia takých proteínov/ligandov, izolovaných v podstate v čistých formách. Všetky uvedené kroky prípravy sú v odbore dobre známe a sú podrobnejšie uvedené v predchádzajúcom a nasledujúcom texte.

35 Vynález sa teraz podrobnejšie opíše pomocou ďalej uvedených, rozsah vynálezu však neobmedzujúcich príkladov a nákresov.

Treba poznamenať, že postupy:

- i) dvojhybridová skríningová a dvojhybridová β -galaktozidázová skúška expresie;
- (ii) indukovaná expresia, metabolické značenie a imunoprecipitácia proteínov;
- 40 (iii) väzba *in vitro* ;
- (iv) hodnotenie cytotoxickosti, a
- (v) northernový prenos a analýza sekvencií,

ako aj ďalšie postupy, použité v ďalej uvedených príkladoch, boli už podrobnejšie opísané v doterajších publikáciách autormi tohto vynálezu z hľadiska iných signálnych proteínov a reakčných dráh (pozri napríklad 45 Boldin et al., (1995a), (1995b) a Boldin et al., (1996)). Tieto postupy sa podrobne nachádzajú tiež v spolumaťstných prihláškách závislých izraelských patentov 114 615, 114 986, 115 319, 116 588, 117 932 a 120 367, ako aj v zodpovedajúcej prihláške PCT číslo PCT/US96/10521). Plné zverejnenie všetkých uvedených publikácií a patentových prihlášok v ich celosti sa tu zahŕňa prinajmenšom v tom, čo sa týka podrob-
ných experimentálnych postupov.

50

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 graficky znázorňuje štruktúru molekuly TRAF.

Obr. 2 a-b zjednodušene znázorňujú niektoré proteíny, ktoré sú v spojení s aktiváciou NF- κ B vrátane nových TRAF-väzbových proteínov podľa tohto vynálezu (napríklad NIK), z ktorých obraz a je čiastková schéma a obraz b je úplnejšia schéma.

Obr. 3 a-b-c znázorňujú nukleotidovú sekvenciu 5'-konca klonu 9 (obr. 3a) a odvodenú kódovanú aminokyselinovú sekvenciu (obr. 3d).

Obr. 4 znázorňuje nukleotidovú sekvenciu klonu 10.

Obr. 5 a-b znázorňujú nukleotidovú sekvenciu klonu 15 (obr. 5a) a jeho odvodenú kódovanú aminokyselinovú sekvenciu (obr. 5b).

Obr. 6 znázorňuje nukleotidovú sekvenciu a odvodenú aminokyselinovú sekvenciu NIK.

Obr. 7 znázorňuje zarovnanie sekvencie proteínu NIK so sekvenciou kinázy proteínu mMEKK myši (MAPK alebo ERK kináza myši) a niekoľkými ďalšími kinázami. Na obraze sú vyznačené oblasti, ktoré zodpovedajú konzervovaným motívom I až XI proteínových kináz.

Príklady uskutočnenia vynálezu**20 Materiály a spôsoby****i) Knižnice cDNA****a) B-bunková cDNA knižnica**

Použila sa oligo dT primová knižnica, skonštruovaná z ľudských B buniek (Durfee et al., (1993)). Uvedené cDNA knižnice sa vložili do polohy XhoI do vektora pSE1107, založenom na pACT fúziou s aktivačnou doménou GAL4.

b) cDNA knižnica λ gt10 z testis

Použila sa cDNA knižnica z ľudských semeníkov. Uvedená knižnica je hexanukleotidová primová knižnica so strednou veľkosťou inzertov 200 až 400 bp.

ii) Kvasinkové kmene

Ako hostiteľské kmene sa na transformáciu a skríning použili dva kmene kvasiniek: kmeň HF7c, ktorý sa použil v dvojhybridovom skríningu a kmeň SFY526, ktorý sa použil pri β -galaktozidázovej analýze. Obidva kmene nesú auxotrofné značkovače *trp1* a *leu2*; významné je, že tieto kmene nemôžu rásť na minimálnom syntetickom médiu s nedostatkom tryptofánu a leucínu, iba ak sú transformované plazmidom, ktorý nesie divoký typ verzie týchto génov (*TRP1*, *LEU2*). Uvedené dva bunkové kmene nesú delečné mutácie v ich génoch *GAL4* a *GAL80* (mutácie *gal4-542* a *gal80-538*).

Kmene SFY526 a HF7c v ich genotypoch nesú *lacZ* reportérové zoskupenie; v kmeni SFY526 fúzované k UAS a TATA časti promótoru *GAL1*; v kmeni HF7c tri kópie *GAL4* 17-mérovej súhlasnej sekvencie a časť TATA promótoru *CYC1* sú fúzované k *lacZ*. Obidva *GAL1* UAS a *GAL4* 17-méry sú schopné reagovať na *GAL4* transkripčný aktivátor. Kmeň HF7c navyše nesie reportérové zoskupenie *HIS3*, fúzované k UAS a časť TATA promótoru *GAL1*.

iii) Klonovanie ľudského TRAF2

Ľudský TRAF2 sa klonoval z HL60 knižnice cDNA (pre TRAF2 sekvenciu; ďalšie podrobnosti pozri Rothe et al., (1994); Rothe et al., (1995); Cheng et al., (1966), Hsu et al., (1966); a Wallach, (1996)). Použité priméry boli: a) 30-merný priamy primér CAGGATCCTATGGCTGCAGCTAGCGTGAC, zodpovedajúci kódujúcej sekvencii hTRAF2, počínajúc od kodóna pre prvý metionín (podčiarknuté) a vrátane linkera s miestom BamHI; b) 32-merný reverzný primér GGTCGACTTAGAGCCCTGTCAGGTCCACAATG, ktorý zahŕňa hTRAF2 génový stop kodón (podčiarknutý) a SalI reštrikčné miesto v jeho linker. Program PCR analýzy zahŕňal najprv denaturačný krok počas 2 minút pri 94 °C, nasledovaný 30 cyklami po 1 minúte pri 94 °C, 1 minútu pri 64 °C a 40 sekúnd pri 72 °C. Amplifikovaný ľudský TRAF2 sa potom vložil do BamHI - SalI miest vektora pGBT9 v spojení s *GAL4* DNA väzbovej domény.

iv) Dvojhybridný skríning knižnice B-buniek

Dvojhybridný skríning je technika (podrobnosti pozri v uvedenej publikácii a prihláškach patentov), ktorá sa používa na identifikáciu faktorov, ktoré sú v spojení s konkrétnou molekulou, ktorá slúži ako „návnada“. V tomto vynáleze ako „návnada“ slúžil TRAF2, ktorý bol klonovaný do vektora pGBT9. TRAF2 bol koexprimovaný v kvasinkovom kmeni HF7c spolu so skríningovanou cDNA knižnicou B-buniek. Uvedený PCR-klonovaný TRAF2 bol rekombinantne fúzovaný s *CAL4* DNA-väzbovou doménou a skríningovaná cDNA knižnica sa fúzovala k *GAL4* aktivačnej doméne vektora pSE1107. Reportérovým génom v HF7c bol *HIS3*,

fúzovaný k protismernej aktivačnej sekvencii (UAS) promótoru GAL1, ktorý reaguje na GAL4 transkripčný aktivátor. Na rast na platniach bez tryptofánu a leucínu sa selektovali transformanty, ktoré obsahovali obidva plazmidy pGBT9 a pSE1107. V druhom kroku sa z platní zbavených tryptofánu, leucínu a histidínu a obsahujúcich 50 mmol.dm⁻³ 3-aminotriazolu (3AT) odobrali pozitívne klony, ktoré exprimovali dvojhybridné proteíny, ktoré vzájomne spolu reagujú, a preto aktivovali GAL1-HIS3.

v) β-galaktózidázová skúška

Odobrané pozitívne klony sa vystavili lacZ skúške vyfarbenia v SFY526 kvasinkových bunkách; postupovalo sa podľa návodov Clontech Laboratories' Manual (podrobnosti sú v uvedenej publikácii a patentových prihláškach). V stručnosti, transformanty sa nechali rásť pri teplote 30 °C počas 2 až 4 dní, až sa dosiahol priemer asi 2 mm, potom sa preniesli na Whatmanove filtre. Filtre sa podrobili spracovaniu zmrazovaním a topením, aby sa dosiahla potrebná permeabilita buniek; potom sa ponorili do tlmivého roztoku (16,1 mg.ml⁻¹ Na₂HPO₄·7H₂O; 5,5 mg.ml⁻¹ NaH₂PO₄·H₂O; 0,75 mg.ml⁻¹ KCl; 0,75 mg.ml⁻¹ MgSO₄·7H₂O, pH = 7), obsahujúcim 0,33 mg.ml⁻¹ X-gal a 0,35 mmol.dm⁻³ β-merkaptetanolu. Kolónie sa monitorovali podľa vývoja modrého sfarbenia, ktoré indikuje indukciu β-galaktózidázy.

vi) Expresia klonovaných cDNA

Skonštruovali sa dva druhy expresných vektorov:

a) vektory založené na pUHD10-3, obsahujúce otvorený čítací rámec (open reading frame, ORF) niektorého z klonov 9, 10 alebo 15, fúzovaného s hemaglutinínovým (HA) epitopom.

b) vektory založené na pUHD10-3, do ktorých bola vložená oktapeptidová FLAG sekvencia práve pred klonovaný TRAF2, v tomto spise označované tiež ako FLAG/B6/TRAF2.

Konstruktory, obsahujúce ORF klonu 9, 10 alebo 15 sa transfektovali do HeLa-Bujardových buniek (o týchto bunkách bližšie pozri Gossen M., a Bujard, M. (1992)) buď samotné, alebo kotransfekované s GLAG/B6/TRAF2 s použitím spôsobu s fosforečnanom vápenatým (spôsob je opísaný napríklad v: Current Protocol in Molecular Biology, ed. Ausubel, F., M., et al.).

vii) Luciferázová skúška

Typicky sa odobralo 5.10⁵ transfekovaných buniek, trikrát premytých so studeným PBS, ktoré sa resuspendovali v 400 μl extrakčného tlmivého roztoku (0,1 mol.dm⁻³ roztok K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH = 7,8; 1 mmol.dm⁻³ roztok DTT). Lýza buniek sa dosiahla trojnásobným zmrazením v tekutom dusíku a roztope-
ním. Zvyšky buniek sa odstránili odstredením (5 minút pri 10 000 x g). Na luciferázovú skúšku sa k 50 μl ly-
zátu pridalo 200 μl luciferázového tlmivého roztoku (25 mmol.dm⁻³ glycyglycínu, 15 mmol.dm⁻³
K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH = 7,8, 15 mmol.dm⁻³ MgSO₄, 4 mmol.dm⁻³ EGTA, 2 mmol.dm⁻³ ATP, 1 mmol.dm⁻³
DTT). Do reakčnej zmesi sa potom pridalo 100 μl 0,2 mmol.dm⁻³ D-luciferínu, 25 mmol.dm⁻³ glycyglycínu
a 1 mmol.dm⁻³ DTT. Luciferázová aktivita sa stanovovala odčítaním svetelnej emisie s použitím luminimet-
rického zariadenia 10 sekundovou integráciou (bližšie podrobnosti pozri v uvedených publikáciách a paten-
tových prihláškach).

Príklad 1

Klonovanie nových klonov, klonu 9, klonu 10 a klonu 15

Knižnica cDNA, pripravená z B-buniek sa podrobila skríningu na proteíny, ktoré sa spájajú s TRAF2 s použitím dvojhybridovej techniky, ako sa opisuje v časti Materiály a spôsoby, odsek (iv). GAL4 DNA väzbová doména a transkripčná aktivačná doména boli nesené spolu iba v transformantoch, ktoré exprimovali TRAF2 a aj proteín, schopný interakcie s ním. Výsledkom bola aktivácia a expresia reportérového génu, v tomto prípade HIS3 fúzovaného k UAS a TATA časti GAL1 promótoru.

Skríning poskytol približne 2 000 klonov, ktoré boli schopné rásť na Trp-, Leu-, His- 3AT platniach. Na kotransfekciu buniek kmeňa SFY526 spolu s TRAF2, klonovaným do vektora GBT9, slúžili DNA, pripravené z 165 náhodne vybraných pozitívnych klonov. Na kolóniách transformovaných kvasinkových SFY526 kolónií sa vykonala skúška na β-galaktózidázovú aktivitu; postup skúšky pozri v časti Materiály a spôsoby (v). Vznikajúce modré zafarbenie poukazovalo na kvasinkové kolónie, ktoré obsahujú cDNA, kódujúce proteín alebo polypeptid, ktorý sa viaže k TRAF2.

Výsledky dvoch hybridových skríningov; schopnosť prenesených klonov rásť na 3AT platniach a schopnosť indukovať LacZ podľa merania modrého sfarbenia sú zhrnuté v tabuľke II. Zo zistených pozitívnych klonov dve cDNA kodovali pre známe proteíny: TRAF2 samotný, ktorý je schopný vlastnej asociácie a tvorby homodiméru, a lymfotoxínový β-receptor, ktorého intracelulárne domény sa ukázali ako schopné viazať TRAF2. Tri z klonovaných cDNA (klony 9, 10 a 15) boli nové.

Pozitívne klony sa ďalej skúšali skúškou na väzbovú špecifickosť, menovite sa skúšali na ich interakciu s irelevantnou návnadou. Ako sa uvádza v tabuľke III, klony 9 a 10 reagujú iba s TRAF2 a neviažu sa ani k

jednému z veľkého počtu skúšaných irelevantných proteínov. Na druhej strane klon 15 sa neviazal k MORT1, ani k intercelulárnym doménam p55 a p75 TNF receptorov, ale vykazujú slabú väzbu k Lamínu a k Cyklínu D.

V snahe zúžiť oblasť TRAF2 molekuly, ktorá vstupuje do interakcie s klonmi 9, 10 a 15 sa pripravili dva ďalšie konštrukty. Jeden konštrukt obsahoval N-terminálnu časť molekuly TRAF2, aminokyseliny 1 až 221, ktoré zahŕňajú štruktúrne motívy „ring finger“ a „zink finger“. Druhý konštrukt zahŕňal iba C-koncovú časť molekuly, aminokyseliny 222 až 501, ktoré prekryávajú „doménu TRAF“ a ďalších 42 aminokyselín. Uvedené dva konštrukty slúžili ako „návnada“ v dvojhybridných skúškach. Výsledky zreteľne ukázali, že zatiaľ čo klony 9, 10 a 15 nevstupujú do interakcie s konštruktom obsahujúcim aminokyseliny 1 až 221 molekuly TRAF, všetky sa viažu k C-terminálnemu konštruktu, obsahujúcemu uvedenú „doménu TRAF“ s rovnakou účinnosťou, ako sa viažali k TRAF2 molekule s úplnou dĺžkou reťazca.

Tabuľka II

Prehľad výsledkov dvojhybridného skríningu s použitím TRAF2 ako „návnady“ a klonov 9, 10 alebo 15

Rast na 50 mmol.dm ⁻³ 3AT	Farebná skúška (minúty)	Identifikačný názov klonu, ako je určený jeho sekvenovaním	Počet nezávislých klonov
+++	10	TRAF2	150
++	20	nový klon číslo 9	6
+++	15	nový klon číslo 10	2
++++	10	Lymfotoxínový β-receptor	2
+	15	nový klon číslo 15	5

Tabuľka III

Skúšky špecifickosti

(interakcia s irelevantnou „návnadou“ v dvojhybridovej skúške)

„Návnada“	Klon 9	Klon 10	Klon 15
LAMIN	-	-	+
cyklín D	-	-	+
p75-IC	-	-	-
p55-IC	-	-	-
MORT1	-	-	-
TRAF2	+++	+++	+++

Vykonaním niekoľkých PCR krokov na cDNA klonu 10 sa klonovala úplná dĺžka cDNA z knižnice cDNA, získanej z RNA z tkaniva človeka. Tento proteín sa označil NIK ako skratka pre „NF-κB indukujúcu kinázu“ pre skutočnosť, že obsahuje proteínovú kinázovú oblasť (pozri ďalej). Treba poznamenať, že keď bola (pred získaním NIK pomocou PCR) pôvodne analyzovaná sekvencia klonu 10 bolo zrejmé, že kóduje pre proteín, pôvodne označovaný NMP1 (pozri spoluvlastnenú závislú IL 117 800). Tento NMP1 alebo klonom 10 kódovaný proteín sa považoval za proteín, ktorý má sekvenciu, zodpovedajúcu I až XI z konzervatívnych motívov, ktoré sú charakteristické pre Ser/Thr proteínové kinázy.

Príklad 2

Sekvenovanie nových klonov

Tri z nových cDNA klonov (klony 9, 10 a 15) sa čistili, amplifikovali v *E. coli* a ich DNA boli predmetom sekvenčnej analýzy. Zistilo sa, že všetky tri klony sú čiastkové cDNA klony.

Celková dĺžka klonov 9, 10 a 15 bola okolo 2 000, 2 700 a 1 300 párov báz.

Obr. 3 a 5 znázorňujú sekvenovanú časť klonov 9 a 15; obr. 4 znázorňuje úplnú sekvenciu klonu 10.

Obr. 5a a 5b znázorňujú úplnú nukleotidovú sekvenciu klonu 15, sekvenovaného z oboch koncov (5' a 3') (obr. 5a) a z nej odvodenú aminokyselinovú sekvenciu (obr. 5b). Zistilo sa, že klon 15, ktorý je čiastkovým cDNA klonom, kóduje proteín dlhý 172 aminokyselín.

Klony 9 a 15 sú čiastkové klony, ktoré postrádajú väčšinu ich 5' zakončenia kódujúcich DNA sekvencií. Odvodené aminokyselinové sekvencie, znázornené na obr. 3b, 4b a 5b, všetky začínajú od prvého nukleotidu príslušného klonu.

Sekvencia klonu 10 (čiastkový cDNA klon), ktorý bol najdôkladnejšie analyzovaný, kóduje pre proteín označovaný NMP1, ako sa uvádza, obsahujúci Ser/Thr proteínové kinázové motívy. Celé dĺžky cDNA klonu, získané z PCR s použitím uvedeného klonu 10 umožnili odhaliť novú TRAF2-väzbovú kinázu NIK, ako sa už opísalo.

Úplná nukleotidová sekvencia a jej odvodená aminokyselinová sekvencia NIK sú uvedené na obr. 6, v ktorom iniciátor ATG je pri nukleotide číslo 232 podčiarknutá a v ktorom stop kodón pri nukleotide číslo

3073 je vyznačený hviezdíčkou. Celkom sekvenovaný klon NIK z obr. 6 má nukleotidovú dĺžku 4 596 nukleotidov, v ktorých je zahrnutá kódujúca sekvencia NIK, ktorá kóduje pre NIK proteín o 947 aminokyselinových zvyškoch.

Prieskum údajov v banke odhalil, že nová aminokyselinová sekvencia NIK vykazuje mimoriadne vysokú homológiu k skupine kináz, z ktorých niektoré sú známe, že slúžia ako MAP kináza kináza kináza.

Obr. 7 znázorňuje zarovnanie:

MEKK (S1) myši,
Byr2 (S2),
Tpl-2 (S3),
Oncogén Ewingovho sarkómu (S4),
SS3 (S5),
(STE11)(S6),
(NPK1)(S7),
(BCK1)(S8) a
(NIK)(S9).

Pri niektorých z uvedených kinázach bola identifikovaná onkogénna aktivita, ktorá sa prejavuje, ak sú kinázy v mutantnej forme.

Príklad 3

Expresia klonovaných cDNA a ich koimunoprecipitácia s TRAF2

HeLa-Bujardove bunky sa transfektovali s TRAF2 v spojení s FLAG, založenom na pUHD10-3 expresnom vektore a s konštruktom, obsahujúcim ORF niektorého z klonov 9, 10 alebo 15, fúzaného k HA epitopu, ako sa opisuje v časti Materiály a spôsoby (iv). Bunka sa potom nechala rásť 24 hodín v Dulbecovom modifikovanom Eagleho prostredí (DMEM) s 10 % telacieho séra s prídavkom ³⁵S-metionínu a ³⁵S-cysteínu. Na koniec inkubačnej doby sa bunky podrobili lýze v rádioimunitnom precipitačnom tlmivom roztoku (10 mmol Tris-HCl, pH 7,5, 150 mmol NaCl, 1 % nonidentu P-40, 1 % deoxycholátu, 0,1 % SDS, a 1 mmol EDTA; 1 ml na 5.10⁵ buniek). Lyzát sa vyčíril inkubáciou s irelevantným antiserom kráľika a perličkami Protein G-Sepharose (Pharmacia, Švédsko). Imunoprecipitácia sa vykonala 1 hodinovou inkubáciou pri 4 °C alikvótnych podielov lyzátu s anti-FLAG (zakúpené od spoločnosti Eastman Kodak Co.) alebo anti-HA (klon 12CASA5 (Field, J., et al., (1988))) monoklonovými protilátkami. Exprimované proteíny sa analyzovali na SDS-PAGE géli s následnou autorádiografiou.

Výsledky týchto experimentov ukazujú, že čiastkové cDNA klony 9, 10 a 15 kódovaných proteínov majú molekulové hmotnosti okolo 50 až 65, 45 a 26 kD.

Nezaznamenala sa nijaká interakcia klonu 15 s TRAF2, ale proteín kódovaný klonmi 9 a 10 (NIK), ako aj úplná dĺžka NIK boli imunoprecipitované s proteínom TRAF2. Vzorky buniek, ktoré boli kotransfektované s TRAF2 a tiež jedným z týchto dvoch klonov a imunoprecipitované, buď s anti-FLAG, alebo s anti-HA protilátkami a následnou analýzou na SDS-PAGE, ako sa opisuje, vykázali tri pásy v každom pruhu; jeden pás zodpovedajúci buď klonu 9 alebo 10, kódovanému proteínom a ďalšie dva pásy tvoria dublet pre 42 a 44 kD, zodpovedajúci TRAF2 proteínu.

Príklad 4

Funkčné skúšky

Zistilo sa, že pri gélovej retardačnej analýze má NIK NF-κB indukciu. Typicky sa transfektovalo 10⁶ 293EBNA buniek buď s 10 µg klonu 10 v pcDNA3 (obr. 7, pruh 1), 3 µg pcDNA3 obsahujúcim cDNA pre p75 TNF receptor (obr. 7, pruh 3), alebo s obidvoma, klonom 10 (10 µg) a p75 TNF receptorom (3 µg), obr. 7 pruh 2. Pri každej tejto transfekcii bolo celkové množstvo transfektovanej DNA 15 µg s „prázdny“ pcDNA3 vektorom. Ako porovnávací kontrola slúžili 293 EBNA bunky, transfektované s 15 µg samotného vektora pcDNA3 (obr. 7, pruh 4). Bunky rástli 24 hodín v prostredí DMEM + 10 % telacieho séra, potom sa oddelili a spracovali podľa Schreiber et al., (Schreiber et al., (1989)). Vzorky boli ďalej spracované na 5 %-nom polyakrylamidovom géli. Monitoroval sa NF-κB s použitím súpravy ³²P-rádioznačených oligonukleotidov, zodpovedajúcich NF-κB väzbovému miestu ako sondy. (Sondy boli GATGCCATTGGGGATTTCCTCTTT a CAGTAAAGAGGAAATCCCCAATGG).

Ako je zrejmé z tabuľky IV, NIK indukoval NF-κB ešte účinnejšie ako TRAF2. Na druhej strane klon 10 vo všeobecnosti nemal uvedený účinok.

Analýza s reportérovým génom sa vykonala nasledovne: bunky 293 EBNA sa kotransfektovali s vektorom pcDNA3, obsahujúcim HIV LTR, viazaný k luciferázovému reportérovému génu buď spolu s pcDNA3 plazmidom, obsahujúcim cDNA pre p75 TNF receptor, alebo s pcDNA3 plazmidom, obsahujúcim klon 10 cDNA, alebo s pcDNA3 plazmidom, obsahujúcim cDNA aj pre p75 TNF receptora aj plazmid pcDNA3, uvedený v tabuľke IV a V.

Výsledky v tabuľke V ukazujú, že

a) transfekcia klonu 10 neaktivuje NF- κ B indukciu, zatiaľ čo NIK áno;
 b) klon 10, ako aj NIK, v ktorom bolo aktívne miesto lyzínu nahradené alanínom (NIK*) silne inhiboval NF- κ B indukciu s cDNA, uvedenými v prvom stĺpci tabuľky IV.

Delícia 3' UTR z NIK (NIK-3'UTR) značne zvyšuje jeho expresiu a následne jeho schopnosť blokovať NF- κ B indukciu, ak je exprimovaný v mutantnej forme.

Tabuľka IV

Aktivácia NF- κ B účinkom NIK, gélová retardačná analýza. Čísla znamenajú počty rádioaktívnych rozpadov, ako boli stanovené fosfozobrazovacou platňou („phosphorimager plate“)

Transfektovaná cDNA	počet rozpadov	plocha (mm ²)
prázdny vektor	327	70,7
TRAF2	3 411	70,7
NIK	6 532	70,7
klon 10	343	70,7

Tabuľka V

Dominantne-negatívny účinok klonu 10, NIK K->A mutanta na indukciu NF- κ B nadexpresiou TRAF2, TRADD, MORT1/FADD, TRNF-I, TNFR-II, chimérou TNFR-I/FAS, RIP a aktivácia NF- κ B účinkom NIK. Luciferázová skúška.

Induktor NF- κ B	prázdny vektor	NIK	NIK-3'UTR	klon 10	NIK*	NIK*-3'UTR	TRAF2 225-501
TRAF2	300	1 000		25	30		ND
TRADD	300	800	1 000	100	100	5	ND
MORT1/FADD	300	1 000		25	80		90
TNFR-I	200	800	1 000	50	100	5	ND
TNFR-II	200	750	800	20	90	6	ND
chiméra FAS	300	1 200		25	50		30
RIP	300	800		75	50		ND
NIK	500			100		10	ND
TNF	200			80			
RelA	1 000	ND	ND	1 000	ND	ND	ND

Pozn.: ND = nestanovené

Príklad 5

Ďalšie charakteristiky NIK

Ako doplnok k skúškam špecifickosti z príkladu 2, ďalšie dvojhybridné skúšanie väzbových vlastností NIK overilo (výsledky sa neuvádzajú), že prvotne izolovaný čiastkový klon NIK (NIK 624-947) sa špecificky viaže k C-terminálnej oblasti TRAF2 (doména C-TRAF), a na rozdiel od neho sa NIK s úplnou dĺžkou viazal s C-TRAF doménou a aj s jej protismernou oblasťou (doména N-TRAF). NIK sa neviazal tiež k TRAF3. Ďalej, chimérové molekuly, obsahujúce doménu C-TRAF z TRAF2 a N-terminálna časť z TRAF3 môžu viazať čiastkovú NIK molekulu (NIK 624-947), ale nie NIK s úplnou dĺžkou, čo poukazuje, že väzba úplnej dĺžky NIK k TRAF2 vyžaduje obidve domény TRAF2: doménu C-TRAF aj doménu N-TRAF.

Okrem toho NIK neasociuje sám so sebou ani viazaný k intracelulárnym doménam receptorov TNF p55 a p75, receptora CD40 (člen receptorovej skupiny TNF / NGF) a receptora FAS/APO1 (CD 95 receptor). NIK sa neviaže tiež k intracelulárnym proteínom, združeným s týmito receptormi, ako sú napríklad TRADD, MORT1 a RIP. Tieto výsledky sú v zhode s uvedenými výsledkami v tabuľke II čo sa týka špecifickosti väzbových vlastností proteínov, kódovaných klonmi 9, 10 a 15. Rôzne interakcie medzi rôznymi receptormi a proteínmi sú schematicky vyznačené na obr.2a a 2B, pričom obr.2b je úplnejší.

Analýza northernovým prenosom ukázala, že jestvuje iba jeden transkript NIKu, exprimovaný rôznymi tkanivami na rôznych úrovniach; uvedený transkript má veľkosť okolo 5 000 nukleotidov, ktoré sú v podstate rovnaké ako klonované NIK cDNA (ako sa poznamenáva, pozri obr. 6).

Ako už bolo uvedené v súvislosti s proteínom, kódovaným klonom 10 (pôvodne označovaného NMP1), proteín NIK s úplnou dĺžkou má tiež serínový/-treonínový proteínový kinázový motív, podobný niekoľkým MAP kináz kináz kinázam (MAPKKK), ako to tiež vyplýva zo zarovnania sekvencií, znázornených na obr. 7.

Skúšky *in vitro* NIK kinázovej aktivity ukázali, že NIK sa môže autofosforylovať, ale nie vtedy, ak aktívne lyzínné miesto a príslušný lyzín sú nahradené alanínom (označenie analógu alebo mutantného NIK ako NIK KK429-430AA, poukazuje na náhradu lyzínu v polohách 429 a 430 alanínom). Toto koreluje tiež s uvedenými výsledkami z príkladu 4, ktoré sa týkajú mutantného NIK* a sú uvedené v tab.IV.

Ako už bolo poznamenané, nadexpresia NIK(u) v 293 EBNA bunkách, indukovala NF- κ B v ešte väčšom rozsahu ako nadexpresia TRAF2, ale nadexpresia čiastkového NIK (NIK 624 - 947) nespôsobila aktiváciu NF- κ B. Navyše, uvedený NIK analóg/mutant NIK KK429 - 430AA tiež nespôsobuje aktiváciu NF- κ B, ak je v týchto bunkách nadbytočne exprimovaný (nadexprimovaný). Potom indukcia NF- κ B účinkom NIK závisí od plnej kinázovej funkcie NIK. Obrátene RIP (pozri obr. 2a a 2b), ktorý má tiež kinázovú doménu môže stále indukovať aktiváciu NF- κ B, aj keď je kinázová aktivita zrušená mutáciou.

Aktivácia NF- κ B po nadexpresii NIK(u) bola nerozlíšiteľná od uvedenej aktivity, produkovanej spracovaním buniek s TNF; a ako u TNF alebo TRAF2 nadexpresii boli základné zložky NIKom aktivovaného NF- κ B tiež p50 a p65. Nadexpresia NIK(u) spôsobila degradáciu I κ B α a blokovanie tejto degradácie s N-acetyl-Leu-Leu-norleucinolom (ALLN) malo za následok (ako s TNF) akumuláciu I κ B molekúl, ktoré majú pomalšiu migráciu pri SDS-PAGE, poukazujúcu na fosforylovaný I κ B α .

Ďalšie skúšky ukázali, že NF- κ B môže byť v bunkách 293-EBNA aktivovaný s TNF, ako aj nadexpresiou receptorov TNF p55 a p75, alebo nadexpresiou receptora TNF p55, v ktorom intracelulárna doména p55 TNF receptora je nahradená doménou receptora FAS/APO1. NF- κ B môže byť aktivovaný tiež nadexpresiou TRAF2, TRADD, RIP alebo MORT1, ale nie deletovaným mutantom MORT1, v ktorom chýba oblasť proti smeru „smrtiacej domény“ z MORT1. Ako už bolo poznamenané, NIK s plnou dĺžkou indukuje aktiváciu NF- κ B, ale nie mutantný NIK KK429 - 430AA, ani čiastkový NIK (NIK 624 - 947). B. Expresia mutantu NIK KK429 - 430AA, alebo NIK 624 - 947 v 293-EBNA bunkách spolu s ktorýmkoľvek iným, skôr uvedeným činidlom, to znamená s receptormi alebo so združenými proteínmi, má navyše za následok blokovanie indukcie aktivácie NF- κ B všetkými z týchto činidiel, čo poukazuje na skutočnosť, že aktivita NIK je priamo zapojená do indukcie NF- κ B. Podobne pozorovaná inhibícia inaktívnymi molekulami NIK koreluje s menším znížením I κ B.

NF- κ B je aktivovaný tiež s IL-1 (pozri schému na obr 2b). Tento účinok sa zdá byť nezávislý od TRAF2 (IL-1 neviaže TRAF2 a účinok IL-1 nie je blokovaný expresiou TRAF2 dominantne negatívneho mutantu). Uvedený účinok IL-1 je však inhibovaný expresiou mutantov NIK. Pozorovaná NF- κ B aktivita po nadexpresii homológa p65 Rel v 293-EBNA bunkách navyše nebola ovplyvnená koexpresiou kinázou deficitných mutantov NIK, čo poukazuje na to, že NIK priamo neovplyvňuje funkciu Rel proteínov, ale zúčastňuje sa na ich receptorovo-indukovanej aktivácii.

Cytotoxická aktivita TNF (zjavne sprostredkovaná s MORT1 združenou proteázou MACH, pozri obr. 2b) je predmetom negatívnej regulácie niektorými NF- κ B indukovateľnými génmi. Antagonizujúce dôsledky gémovej indukcie, sprostredkovanej NF- κ B a aktivácie MACH môžu vysvetľovať prečo TNF sám, ako aj IL-1 môžu vyvolať bunkovú rezistenciu proti cytotoxickosti TNF. V súlade s uvedeným a v zhode s týmto vynálezom sa tiež zistilo, že expresia NIK dominantne negatívnych mutantov v 293-EBNA bunkách významne zvyšuje ich citlivosť na ničenie účinkom TNF, a že nadexpresia prírodného (s úplnou dĺžkou, divoký typ) NIK inhibuje ničenie uvedených buniek účinkom TNF, alebo účinkom nadexpresie p55 TNF receptora; (tento receptor má intracelulárnu doménu, obsahujúcu oblasť „smrtiacej domény“, ktorá - ak je exprimovaná v bunkách - za neprítomnosti TNF môže vyvolať jej vlastnú bunkovú cytotoxickosť - pozri citované publikácie autorov tohto vynálezu a spoluvlastnené závislé prihlášky).

40 Príklad 6

Ďalšie funkčné skúšky biologickej aktivity NIK

V zhode s týmto vynálezom sa tiež zistilo, že expresia NIK- dominantne negatívnych mutantov mohla tiež blokovať indukciu aktivácie NF- κ B v 293-EBNA bunkách ďalšími indukčnými činidlami, ktoré zahŕňajú napríklad (i) známy bakteriálny endotoxín, lipopolysacharid (LPS); (ii) známy acetát-myristát forbolu, ktorý je známy ako proteínový kinázový C aktivátor; (iii) HTLV-1 proteín TAX.

Ďalej sa zistilo, že expresia dominantne -negatívnych mutantov NIK v 293-EBNA bunkách nemá v podstate vplyv na TNF indukovanú aktiváciu Jun kinázy, čo poukazuje na to, že NIK pôsobí špecifickým a pravdepodobne priamym spôsobom na posilnení fosforylácie I κ B bez ovplyvnenia kináz MAP, zapojených do fosforylácie Jun.

Z hľadiska všetkého, čo sa doteraz uviedlo vyplýva, že kinázová aktivita NIK je časťou signálnej kaskády, ktorá je zodpovedná za aktiváciu NF- κ B a ktorá je spoločná dvom TNF receptorom, FAS/APO1 receptoru a IL-1 receptoru. Zdá sa, že NIK má v tejto kaskáde špecifickú úlohu. Väzba NIK k TRAF2 môže slúžiť k tomu, aby bol NIK ovplyvňovaný obidvoma uvedenými receptormi. Podľa podobnosti s MAP kinázovou kaskádou môže NIK potom, ako bol privedený s TRAF k stimulovaným receptorom, slúžiť ako substrát pre kinázu (MAPKKKK); a keď je NIK fosforylovaný, fosforyluje a aktivuje iné kinázy (alebo môže priamo vyvolať aktiváciu NF- κ B priamou fosforyláciou I κ B). Uvedená IL-1-vyvolaná NF- κ B aktivácia je nezávislá od TRAF2, a preto aktivácia NIK receptorom IL-1 môže byť sprostredkovaná ďalším proteínom IRAK, sérinovou/treonínovou kinázou, ktorá je po stimulácii rekrutovaná k IL-1 receptoru (Cao et al., (1996b)). Ako už bolo poznamenané, vhodným terčom pre NIK, alebo pre ním aktivovanú kaskádu je I κ B. NIK môže tiež fos-

forylovať TRAF proteíny alebo regulačné proteíny, ktoré sa k nemu viažu, napríklad TANK-I/TRAF (pozri Cheng a Baltimore, (1996)), vytvárajúc tak kotviace miesta pre ďalšie proteíny.

5 PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaný polypeptid, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B, ktorý obsahuje:

a) aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO: 5;

b) aminokyselinovú sekvenciu fragmentu a), ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B;

10 c) aminokyselinovú sekvenciu analógu a) alebo b), ktorý nemá viac ako desať zmien v aminokyselinovej sekvencii a) alebo b), pričom každá takáto zmena je substitúciou, deléciou alebo inzerciou aminokyseliny, pričom tento analóg sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B.

2. Izolovaný polypeptid podľa nároku 1, ktorý obsahuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:5.

3. Izolovaná DNA sekvencia kódujúca polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

15 4. Izolovaná DNA sekvencia kódujúca polypeptid podľa nároku 1, ktorý sa viaže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- κ B, ktorá je vybraná zo skupiny obsahujúcej:

(i) cDNA sekvenciu obsahujúcu nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:4;

(ii) fragment sekvencie (i), ktorý kóduje polypeptid viažuci sa na TRAF2 a modulujúci aktivitu NF- κ B.

5. Izolovaná DNA sekvencia podľa nároku 4, ktorá obsahuje nukleotidovú sekvenciu SEQ ID NO:1.

20 6. Vektor obsahujúci DNA sekvenciu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 5.

7. Vektor podľa nároku 6, ktorý je schopný exprimovať sa v eukaryotickej hostiteľskej bunke.

8. Vektor podľa nároku 6, ktorý je schopný exprimovať sa v prokaryotickej hostiteľskej bunke.

9. Transformovaná eukaryotická alebo prokaryotická hostiteľská bunka obsahujúca vektor podľa nároku 6.

25 10. Spôsob produkcie TRAF-väzobného proteínu, jeho izoformy, fragmentu alebo analógu podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa pestovanie transformovanej hostiteľskej bunky podľa nároku 9 v podmienkach vhodných na expresiu tohto proteínu, jeho izoformy, fragmentu alebo analógu, v prípade potreby post-translačnú modifikáciu, a izoláciu exprimovaného proteínu, jeho izoformy, fragmentu alebo analógu.

30 11. Protilátky alebo ich aktívne fragmenty špecifické pre polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

12. Spôsob izolácie a identifikácie polypeptidu podľa nároku 1 alebo 2, ktorý je schopný priamo sa viazať na TRAF2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa aplikuje kvasinkový dvojhybridný postup, pri ktorom je sekvencia kódujúca TRAF2 nesená jedným hybridným vektorom, a sekvencia z cDNA knižnice alebo z genomickej DNA knižnice je nesená druhým hybridným vektorom, pričom tieto vektory sa potom použijú na transformáciu kvasinkových hostiteľských buniek a pozitívne transformované bunky sa izolujú, následne sa extrahuje druhý hybridný vektor na získanie sekvencie kódujúcej proteín, ktorý sa viaže na TRAF2.

35 13. Farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje ako účinnú zložku najmenej jeden polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

40 14. Farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje ako účinnú zložku rekombinantný živočíšny vírusový vektor kódujúci proteín, ktorý je schopný viazať sa na bunkový povrchový receptor, a kódujúci najmenej jeden polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

45 15. Farmaceutický prostriedok na moduláciu TRAF2 modulovaného/sprostredkovaného účinku na bunky, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako účinnú zložku obsahuje oligonukleotidovú sekvenciu kódujúcu anti-sense sekvenciu mRNA kódujúcej polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

50 16. Farmaceutický prostriedok na prevenciu alebo liečenie patologického stavu asociovaného s indukciou NF- κ B, na ktorý sa viaže polypeptid podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje účinné množstvo proteínu podľa nároku 1 alebo 2, alebo DNA molekuly, ktorá ho kóduje tento proteín.

17. Spôsob skríningu ligandu schopného viazať sa na polypeptid podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa uvedenie afinitnej chromatografickej matrice, na ktorú je pripojený polypeptid, do kontaktu s bunkovým extraktom na naviazanie ligandu na túto maticu, a následné eluovanie, izoláciu a analýzu ligandu.

55 18. Spôsob identifikácie a izolácie DNA kódujúcej polypeptid podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa aplikáciu kvasinkového dvoj-hybridného postupu, pri ktorom je sekvencia kódujúca polypeptid nesená jedným hybridným vektorom a sekvencie z cDNA alebo z genomickej DNA knižnice sú nesené druhým hybridným vektorom, transformáciu kvasinkových hostiteľských buniek týmito vektormi, izoláciu pozitívne transformovaných buniek a extrakciu druhého hybridného vektora na získanie sekvencie kódujúcej uvedený ligand.

60

19. Anti-sense oligonukleotid pozostávajúci zo sekvencie komplementárnej s aspoň časťou mRNA kódujúcej TRAF2-väzobný polypeptid obsahujúci aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID NO:5, pričom tento anti-sense oligonukleotid je schopný účinne blokovať transláciu uvedenej mRNA.

20. Použitie polypeptidu podľa nároku 1 alebo 2 na výrobu farmaceutického prostriedku na podávanie pacientovi, ktorý trpí patologickým stavom asociovaným s indukciou NF- κ B, na ktorý sa viaže polypeptid podľa nároku 1 alebo 2.

Zoznam sekvencií

10 (1) Všeobecná informácie:

(i) Prihlasovateľ:

(A) Meno: Yeda Research and Development Co. Ltd.

(B) Ulica: Weizmann Institute of Science

(C) Mesto: P.O. Box 95

15 (D) Štát: Rehovot

(E) Krajina: Izrael

(F) Poštový kód (ZIP): 76 100

(G) Telefón: +972-8-9 344 093

(H) Fax: +972-8-9 470 739

20

(A) Meno: David Wallach

(B) Ulica: 24 Borochoy Street

(C) Mesto: Rehovot

(E) Krajina: Izrael

25

(F) Poštový kód (ZIP): 76 406

(A) Meno: Nikolaj Malinin

(B) Ulica: Beit Clore, Weizmann Institute of Science

(C) Mesto: Rehovot

30

(E) Krajina: Izrael

(F) Poštový kód (ZIP): 76 100

(A) Meno: Mark Boldin

(B) Ulica: Beit Clore, Weizmann Institute of Science

35

(C) Mesto: Rehovot

(E) Krajina: Izrael

(F) Poštový kód (ZIP): 76 100

(A) Meno: Andrej Kovalenko

40

(B) Ulica: Beit Clore, Weizmann Institute of Science

(C) Mesto: Rehovot

(E) Krajina: Izrael

(F) Poštový kód (ZIP): 76 100

45

(A) Meno: Igor Mett

(B) Ulica: 60 Levin Epstein Street

(C) Mesto: Rehovot

(E) Krajina: Izrael

(F) Poštový kód (ZIP): 76 462

50

- (ii) Názov vynálezu: Modulátory faktora združeného s receptormi TNF (TRAF), ich príprava a použitie

- (iii) Počet sekvencií: 11

- (iv) Počítačom čitateľný tvar:

55

(A) Druh média: pružný disk

(B) Počítač: IBM PC kompatibilný

(C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS

(D) Programové vybavenie: PatentIn Release No. 1, verzia 1.30 (EPO)

60

- (v) Údaje súčasnej prihlášky

Číslo prihlášky: PCT/IL97/00 117
(vi) Údaje o predchádzajúcej prihláške:

(A) Číslo prihlášky: IL 117 800

(B) Dátum podania: 2. apríl 1996

5 (vi) Údaje o predchádzajúcej prihláške:

(A) Číslo prihlášky: IL 119 133

(B) Dátum podania: 26. august 1996

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 1 :

10 (i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 1 906 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vláknitosť: jednovláknová

15 (D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: cDNA

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 1:

```

CATTGGGTCA CGCGGTGGCG GCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCAGGCTG CAGGAATTCG      60
ATTCGAGGCC ACGAAGGCCG GCGGCGCGGC GCANGCACCG GCCCGGGGAN AGGCNCCATG      120
AGCGGATCNC NGAACNATGA CAAAAGACAA TTTCTGCTGG AGCGACTGCT GGATGCAGTG      180
AAACAGTGCC AGATCCGCTT TNGAGGGAGA AAGGAGATTG CCTCGGATTC CGACAGCAGG      240
GTCACCTGTC TGTGTGCCCA GTTTGAAGCC GTCCTGCAGC ATGGCTTGAA GAGGAGTCGA      300
GGATTGGCAC TCACAGCGGC AGCGATCAAG CAGGCAGCGG GCTTTGCCAG CAAAACCGAA      360
ACAGAGCCCG TGTCTGGTA CTACGTGAAG GAGGTCCTCA ACAAGCACGA GCTGCAGCGC      420
TTCTACTCCC TCGCCACAT CGCCTCAGAC GTGGGCCGGG GTCGCGCCTG GCTGCGCTGT      480
GCCCTCAACG AACACTCCCT GGAGCGCTAC CTGCACATGC TCCTGGCCGA CCGCTGCAGG      540
CTGAGCACTT TTTATGAAGA CTGGTCTTTT GTGATGGATG AAGAAAGGTC CAGTATGCTT      600
CCTACCATGG CAGCAGGTCT GAACTCCATA CTCCTTGCGA TTAACATCGA CAACAAGGAT      660
TTGAACGGGC AGAGTAAGTT TGCTCCCACC GTTTCAGACC TCTTAAAGGA GTCAACGCAG      720
AACGTGACCT CTTGTGTGAA GGAGTCCACG CAAGGAGTGA GCAGCCTGTT CAGGGAGATC      780
ACAGCCTCCT CTGCCGTCTC CATCCTCATC AAACCTGAAC AGGAGACCGA CCCTTGCTG      840
TCGTGTCCAG GAATGTCAGT GCTGATGCCA AATGCAAAAA GGAGCGGAAG AAGAAAAAGA      900
AAGTGACCAA CATAATCTCA TTTGATGATG AGGAAGATGA GCAGAACTCT GGGGACGTGT      960
TTAAAAAGAC ACCTGGGGCA GGGGAGAGCT CAGAGGACAA CTCCGACCGC TCCTCTGTCA     1020
ATATCATGTC CGCCTTTGAA AGCCCCTTCG GGCCTAACTC CAATGGAATC AGAGCAGCAA     1080
CTCATGGAAA ATTGATTCCC TGTCTTTGAA CGGGGAGTTT GGGTACCAGA AGCTTGATGT     1140
GAAAAGCATC GATGATGAAG ATGTGGATGA AAACGAAGAT GACGTGTATG GAAACTCATC     1200
AGGAAGGAAG CACAGGGGCC ACTCGGAGTC GCCCGAGAAG CCACTGGAAG GGAACACCTG     1260
CCTCTCCCAG ATGCACAGCT GGGCTCCGCT GAAGGTGCTG CACAATGACT CCGACATCCT     1320
CTTCCCTGTC AGTGGCGTGG GCTCCTACAG CCCAGCAGAT GCCCCCTCG GAAGCCTGGA     1380

```

GAACGGGACA GGACCAGAGG ACCACGTTCT CCCGGATCCT GGA CTTCGGT ACAGTGTGGA 1440
 AGCCAGCTCT CCAGGCCACG GAAGTCCTCT GAGCAGCCTG TTACTTCTGC CTCAGTGCCA 1500
 GAGTCCATGA CAATTAGTGA ACTGCGCCAG GCCACTGTGG CCATGATGAA CAGGAAGGAT 1560
 GAGCTGGAGG AGGAGAACAG ATCACTGCGA AACCTGCTCG ACGGTGAGAT GGAGCACTCA 1620
 GCCGCGCTCC GGCAAGAGGT GGACACCTTG AAAAGGAAGG TGGCTGAACA GGAGGAGCGG 1680
 CAGGGCATGA AGGTCCAGGC GCTGGCCAGC TATCTTTGCT ATTTTGTGAG GAGATTCTAA 1740
 CCCCACGTGA GAACCATGTG GTGGAGAAAT GGAGGGAGAG AGAAATCCAA CAGTTCCTGA 1800
 TAGTCTCATT TGAGCTCCTG GATCCAGTCT TTCCTGAAGC TGTGTTTCCT CTGGACTTTT 1860
 CATGTATGTG AGCCAATAAA TTGCTTTCAT TCCTTGAAAA AAAAAA 1906

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 2 :

(i) Charakteristika sekvencie:

- 5 (A) Dĺžka: 604 aminokyselín
 (B) Typ: aminokyselina
 (C) Vlákňitosť: jednovláknová
 (D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: proteín

10 (xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 2:

Xaa Thr Gly Pro Gly Xaa Gly Xaa Met Ser Gly Ser Xaa Asn Xaa Asp
 1 5 10 15
 Lys Arg Gln Phe Leu Leu Glu Arg Leu Leu Asp Ala Val Lys Gln Cys
 20 25 30
 Gln Ile Arg Phe Xaa Gly Arg Lys Glu Ile Ala Ser Asp Ser Asp Ser
 35 40 45
 Arg Val Thr Cys Leu Cys Ala Gln Phe Glu Ala Val Leu Gln His Gly
 50 55 60
 Leu Lys Arg Ser Arg Gly Leu Ala Leu Thr Ala Ala Ala Ile Lys Gln
 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Phe Ala Ser Lys Thr Glu Thr Glu Pro Val Phe Trp Tyr
 85 90 95
 Tyr Val Lys Glu Val Leu Asn Lys His Glu Leu Gln Arg Phe Tyr Ser
 100 105 110
 Leu Arg His Ile Ala Ser Asp Val Gly Arg Gly Arg Ala Trp Leu Arg
 115 120 125
 Cys Ala Leu Asn Glu His Ser Leu Glu Arg Tyr Leu His Met Leu Leu
 130 135 140
 Ala Asp Arg Cys Arg Leu Ser Thr Phe Tyr Glu Asp Trp Ser Phe Val
 145 150 155 160
 Met Asp Glu Glu Arg Ser Ser Met Leu Pro Thr Met Ala Ala Gly Leu
 165 170 175
 Asn Ser Ile Leu Phe Ala Ile Asn Ile Asp Asn Lys Asp Leu Asn Gly
 180 185 190
 Gln Ser Lys Phe Ala Pro Thr Val Ser Asp Leu Leu Lys Glu Ser Thr
 195 200 205
 Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Lys Glu Ser Thr Gln Gly Val Ser Ser
 210 215 220
 Leu Phe Arg Glu Ile Thr Ala Ser Ser Ala Val Ser Ile Leu Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Glu Gln Glu Thr Asp Pro Cys Leu Ser Cys Pro Gly Met Ser Val
 245 250 255

Leu Met Pro Asn Ala Lys Arg Ser Gly Arg Arg Lys Arg Lys Xaa Pro
 260 265 270
 Thr Xaa Ser His Leu Met Met Arg Lys Met Ser Arg Thr Leu Gly Thr
 275 280 285
 Cys Leu Lys Arg His Leu Gly Gln Gly Arg Ala Gln Arg Thr Thr Pro
 290 295 300
 Thr Ala Pro Leu Ser Ile Ser Cys Pro Pro Leu Lys Ala Pro Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Thr Pro Met Glu Ser Glu Gln Gln Leu Met Glu Asn Xaa Phe Pro
 325 330 335
 Val Phe Glu Arg Gly Val Trp Val Pro Glu Ala Xaa Cys Glu Lys His
 340 345 350
 Arg Xaa Xaa Arg Cys Gly Xaa Lys Arg Arg Xaa Arg Val Trp Lys Leu
 355 360 365
 Ile Arg Lys Glu Ala Gln Gly Pro Leu Gly Val Ala Arg Glu Ala Thr
 370 375 380
 Gly Arg Glu His Leu Pro Leu Pro Asp Ala Gln Leu Gly Ser Ala Glu
 385 390 395 400
 Gly Ala Ala Gln Xaa Leu Arg His Pro Leu Pro Cys Gln Trp Arg Gly
 405 410 415
 Leu Leu Gln Pro Ser Arg Cys Pro Pro Arg Lys Pro Gly Glu Arg Asp
 420 425 430
 Arg Thr Arg Gly Pro Arg Ser Pro Gly Ser Trp Thr Ser Val Gln Cys
 435 440 445
 Gly Ser Gln Leu Ser Arg Pro Arg Lys Ser Ser Glu Gln Pro Val Thr
 450 455 460
 Ser Ala Ser Val Pro Glu Ser Met Thr Ile Ser Glu Leu Arg Gln Ala
 465 470 475 480
 Thr Val Ala Met Met Asn Arg Lys Asp Glu Leu Glu Glu Glu Asn Arg
 485 490 495
 Ser Leu Arg Asn Leu Leu Asp Gly Glu Met Glu His Ser Ala Ala Leu
 500 505 510
 Arg Gln Glu Val Asp Thr Leu Lys Arg Lys Val Ala Glu Gln Glu Glu
 515 520 525
 Arg Gln Gly Met Lys Val Gln Ala Leu Ala Ser Tyr Leu Cys Tyr Phe
 530 535 540
 Val Arg Arg Phe Xaa Pro His Val Arg Thr Met Trp Trp Arg Asn Gly
 545 550 555 560
 Gly Arg Glu Lys Ser Asn Ser Ser Xaa Xaa Ser His Leu Ser Ser Trp
 565 570 575
 Ile Gln Ser Phe Leu Lys Leu Cys Phe Leu Trp Thr Phe His Val Cys
 580 585 590
 Glu Pro Ile Asn Cys Phe His Ser Leu Lys Lys Lys
 595 600

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 3 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 2 631 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitosť: jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: cDNA

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 3:

5 CCCCTCTCAC AGCCCAGGCC ATCCAAGAGG GGCTGAGGAA AGAGCCCATC CACCGCGTGT 60
 CTGCAGCGGA GCTGGGAGGG AAGGTGAACC GGGCACTACA GCAAGTGGGA GGTCTGAAGA 120
 GCCCTTGGAG GGGAGAATAT AAAGAACCAA GACATCCACC GCCAAATCAA GCCAATTACC 180
 ACCAGACCCT CCATGCCCAG CCGAGAGAGC TTTCGCCAAG GGCCCCAGGG CCCCAGCCAG 240
 CTGAGGAGAC AACAGGCAGA GCCCCTAAGC TCCAGCCTCC TCTCCCACCA GAGCCCCCAG 300
 AGCCAAACAA GTCTCCTCCC TTGACTTTGA GCAAGGAGGA GTCTGGGATG TGGGAACCCT 360
 TACCTCTGTC CTCCCTGGAG CCAGCCCCTG CCAGAAACCC CAGCTCACCA GAGCGGAAAG 420
 CAACCGTCCC GGAGCAGGAA CTGCAGCAGC TGGAAATAGA ATTATTCCTC AACAGCCTGT 480
 CCCAGCCATT TTCTCTGGAG GAGCAGGAGC AAATTCTCTC GTGCCTCAGC ATCGACAGCC 540
 TCTCCCTGTC GGATGACAGT GAGAAGAACC CATCAAAGGC CTCTCAAAGC TCGCGGGACA 600
 CCCTGAGCTC AGGCGTACAC TCCTGGAGCA GCCAGGCCGA GGCTCGAAGC TCCAGCTGGA 660
 ACATGGTGCT GGCCCCGGGG CGGCCACCG ACACCCCAAG CTATTTCAAT GGTGTGAAAG 720
 TCCAAATACA GTCTCTTAAT GGTGAACACC TGCACATCCG GGAGTTCCAC CGGGTCAAAG 780
 TGGGAGACAT CGCCACTGGC ATCAGCAGCC AGATCCCAGC TGCAGCCTTC AGCTTGGTCA 840
 CCAAAGACGG GCAGCCTGTT CGCTACGACA TGGAGGTGCC AGACTCGGGC ATCGACCTGC 900
 AGTGCACACT GGCCCCCTGAT GGCAGCTTCG CCTGGAGCTG GAGGGTCAAG CATGGCCAGC 960
 TGGAGAACAG GCCCTAAGCC TGCCCTCCAC CGCCGGCTCC ACACTGCCGG AAAGCAGCCT 1020
 TCCTGCTCGG TGCACGATGC TGCCCTGAAA ACACAGGCTC AGCCGTTCCC AGGGGATYTG 1080
 NCCAGCCCCC CGGCTCARCA GNTGGGAACC AGGGCCTCGN CAGCNAGCNA AGGTNGGGGG 1140
 CAAGCNAGAA TGCCCTCCAG GATTTACAN CCTGAGCCCN TGCCCCANCC CTGCTGAADA 1200
 AAACAYTNCC GCCACGTGAA GAGACAGAAG GAGGATGGNC AGGAGTTNNA CCTYGGGGAA 1260
 ACAAACAGG GATCTTTNTT CTGCCCTGTC TCCAGTNCGA GTTGGCCTGN ACCCGCTTGG 1320
 ANTCAGTGAC CATTTGTTGG CAGANCAGGG GAGAGCAGCT TCCAGCCTGG GTCAGAAGGG 1380
 GTGGGCGAGC CCTTCGGCCC CTCACCTTNC CAGGCTGCTG TGNAGAGTGT CAAGTGTGTA 1440
 AGGGNCCCCA ANCTCAGGNT TCAGTGCAGA ACCAGGTNCA GCAGGTATGC CCGCCCGNTA 1500
 GGTTAANNNG GGGCCCTCTN AAACCCCTTG CCTNGGCCTN CACCTNGGCC AGCTCANCCC 1560
 CTTTTGGGTG TAGGGGAAAA GAATGCCTGA CCCTGGGAAG GCTWCCCTGG TAGAATACAC 1620

CACACTTTTC	AGGTTGTTGC	AACACAGGTC	CTGAGTTGAC	CTCTGGTTCA	GCCAAGGACC	1680
AAAGAAGGTG	TGTAAGTGAA	GTGTTTCTCA	GTNCCCCAGA	CATGTGCCCC	TTTGCTGCTG	1740
GCTACCACTC	TTCCCCAGAG	CAGCAGGCCC	CGAGCCCCCTT	CAGGCCCAGC	ACTGCCCCAG	1800
ACTCGCTGGC	ACTCAGTTCC	CTCATCTGTA	AAGGTGAAGG	GTGATGCAGG	ATATGCCTGA	1860
CAGGAACAGT	CTGTGGATGG	ACATGATCAG	TGCTNAAGGN	AAAGCAGCAG	AGAGAGACGY	1920
TCCGGCGCCC	CAGNCCCCAC	TNATCAGTGT	NCCAGCGTGC	TNGGTTNCCC	CAGNAGCACA	1980
GCTNCAGNCA	TCANCACTGA	CACTNCACCC	TNGCCCTGCC	CCTNGGCCAN	GAGGGTACTG	2040
CCGNACGGCA	CTTTGCACNT	CTGATGNACC	TCAAAGCACT	TTCATGGCTN	GCCCTCTNNG	2100
GCAGGGNCAG	GGNCAGGGNC	AGTGACANCT	GTAGGNAGCA	TANGCAANGC	CAGGAGATGG	2160
GGTGNAAGGG	ANCACAGTCT	TGAGCTGTCC	ANCATGCATG	TGACTNCCTC	AAACCTCTTN	2220
NCCAGNATTT	CTCTAAGAAT	AGCANCCCCC	TNCCCCCATT	GCCCCAGCTT	AGCCTCTTCT	2280
CCCAGGGGAG	CTANCTCAGG	ACTCACGTAG	CATTAAATCA	GCTGTGNAAT	CGTCAGGGGG	2340
TGTCTGCTAG	CCTCAACCTC	CTGGGGCAGG	GGACGCCGAG	ACTCCGTGGG	AGAAGCTCAT	2400
TCCCACATCT	TGCCAAGACA	GCCTTTNGTC	CAGCTGTCCA	CATTGAGTCA	GA CTGCTCCC	2460
GGGGAGAGAG	CCCCGGCCCC	CAGCACATAA	AGAACTGCAG	CCTTGGTACT	GCAGAGTCTG	2520
GGTTGTAGAG	AACTCTTTGT	AAGCAATAAA	GTTTGGGGTG	ATGACAAATG	TTAAAAAAG	2580
GCCTTCGTGG	CCTCGAATCA	AGCTTATCGA	TACCGTCGAC	CTCGAGGGGG	G	2631

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 4 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 1 253 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitosť: jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: cDNA

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 4:

CATTGGAGTC	ACGCGGTGGC	GGCGCTCTAG	AATAGTGGAT	CCCCGGGCTG	CANGGAATTC	60
GATTCGAGCC	CACGAAGGCC	CCTTCTTCTG	TGGTCGCGGC	ACGTTTACAG	CCGCAAGCAC	120
CCAGCGGCAG	CTGAAGGAGG	CTTTTGAGAG	GCTCCTGCCC	CAGGTGGAGG	CGGCCCCGAA	180
GGCCATCCGC	GCCGCTCAGG	TGGAGCGCTA	TGTGCCCGAA	CACGAGCGAT	GCTGCTGGTG	240
CCTGTGCTGC	GGCTGTGAGG	TGCGGGAACA	CCTGAGCCAT	GGAAACCTGA	CGGTGCTGTA	300
CGGGGGGCTG	CTGGAGCATC	TGGCCAGCCC	AGAGCACAAG	AAAGCAACCA	ACAAATTCTG	360
GTGGGAGAAC	AAAGCTGAGG	TCCAGATGAA	AGAGAAGTTT	CTGGTCACTC	CCCAGGATTA	420
TGCGCGATTC	AAGAAATCCA	TGGTGAAAGG	TTTGGATTCC	TATGAAGAAA	AGGAGGATAA	480
AGTGATCAAG	GAGATGGCAG	CTCAGATCCG	TGAGGTGGAG	CAGAGCCGAC	AGGAGGTGGT	540

TCGGTCTGTC TTAGAGCCTC AGGCAGTGCC AGACCCAGAA GAGGGCTCTT CAGCACCTAG 600
 AAGCTGGAAG GGGATGAACA GCCAAGTAGC TTCCAGCTTA CAGCAGCCCT CAAATTTGGA 660
 CCTGCCACCA GCTCCAGAGC TTGACTGGAT GGAGACAGGA CCATCTCTGA CATTCAATTGG 720
 CCATCAGGAT ATACCAGGAG TTGGTAACAT CCACTCAGGT GCCACACCTC CCTGGATGAT 780
 CCAAGATGAA GAATACATTG CTGGGAACCA AGAAATAGGA CCATCCTATG AAGAATTTCT 840
 TAAAGAAAAG GAAAAACAGA AGTTGAAAAA ACTCCCCCA GACCGAGTTG GGGCCAACTT 900
 TGATCACAGC TCCAGGACCA GTGCAGGCTG GCTGCCCTCT TTTGGGCCGC GTCTGGAATA 960
 ATGGACGCCG CTGGCAGTCC AGACATCAAC TCCAAAACCTG AAGCTGCAGC AATGAAGAAG 1020
 CAGTCACATA CAGAAAAAAG CTAATCATGC TCTCTACCAA CTACCATGAG GCTAAAAGCC 1080
 AAAGTCAACC AAACCCCTAT TATACCTTCC ACCCAAATTC TTTATCATTG TCTTTCTTAG 1140
 GAAACAGACA TACTCATTCA TTTGATTTAA TAAAGTTTTA TTTTTCGGCC TTCGTGGCCT 1200
 CGAATCAAGC TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC CGTACCCACT TTT 1253

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 5 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 417 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vlákňitosť: jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 5:

Ile Gly Val Thr Arg Trp Arg Arg Ser Arg Ile Val Asp Pro Arg Ala
 1 5 10 15
 Ala Xaa Asn Ser Ile Arg Ala His Glu Gly Pro Phe Phe Cys Gly Arg
 20 25 30
 Gly Thr Phe Thr Ala Ala Ser Thr Gln Arg Gln Leu Lys Glu Ala Phe
 35 40 45
 Glu Arg Leu Leu Pro Gln Val Glu Ala Ala Arg Lys Ala Ile Arg Ala
 50 55 60
 Ala Gln Val Glu Arg Tyr Val Pro Glu His Glu Arg Cys Cys Trp Cys
 65 70 75 80
 Leu Cys Cys Gly Cys Glu Val Arg Glu His Leu Ser His Gly Asn Leu
 85 90 95
 Thr Val Leu Tyr Gly Gly Leu Leu Glu His Leu Ala Ser Pro Glu His
 100 105 110
 Lys Lys Ala Thr Asn Lys Phe Trp Trp Glu Asn Lys Ala Glu Val Gln
 115 120 125

Met Lys Glu Lys Phe Leu Val Thr Pro Gln Asp Tyr Ala Arg Phe Lys
 130 135 140
 Lys Ser Met Val Lys Gly Leu Asp Ser Tyr Glu Glu Lys Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 Val Ile Lys Glu Met Ala Ala Gln Ile Arg Glu Val Glu Gln Ser Arg
 165 170 175
 Gln Glu Val Val Arg Ser Val Leu Glu Pro Gln Ala Val Pro Asp Pro
 180 185 190
 Glu Glu Gly Ser Ser Ala Pro Arg Ser Trp Lys Gly Met Asn Ser Gln
 195 200 205
 Val Ala Ser Ser Leu Gln Gln Pro Ser Asn Leu Asp Leu Pro Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Leu Asp Trp Met Glu Thr Gly Pro Ser Leu Thr Phe Ile Gly
 225 230 235 240
 His Gln Asp Ile Pro Gly Val Gly Asn Ile His Ser Gly Ala Thr Pro
 245 250 255
 Pro Trp Met Ile Gln Asp Glu Glu Tyr Ile Ala Gly Asn Gln Glu Ile
 260 265 270
 Gly Pro Ser Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Glu Lys Glu Lys Gln Lys Leu
 275 280 285
 Lys Lys Leu Pro Pro Asp Arg Val Gly Ala Asn Phe Asp His Ser Ser
 290 295 300
 Arg Thr Ser Ala Gly Trp Leu Pro Ser Phe Gly Pro Arg Leu Glu Xaa
 305 310 315 320
 Trp Thr Pro Leu Ala Val Gln Thr Ser Thr Pro Lys Leu Lys Leu Gln
 325 330 335
 Gln Xaa Arg Ser Ser His Ile Gln Lys Lys Ala Asn His Ala Leu Tyr
 340 345 350
 Gln Leu Pro Xaa Gly Xaa Lys Pro Lys Ser Thr Lys Pro Leu Leu Tyr
 355 360 365
 Leu Pro Pro Lys Phe Phe Ile Ile Val Phe Leu Arg Lys Gln Thr Tyr
 370 375 380
 Ser Phe Ile Xaa Phe Asn Lys Val Leu Phe Phe Gly Leu Arg Gly Leu
 385 390 395 400
 Glu Ser Ser Leu Ser Ile Pro Ser Thr Ser Arg Gly Gly Arg Thr His
 405 410 415
 Phe

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 6 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 4 956 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitosť: jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: cDNA

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 6:

AGCGGGGGGA CTGTGCCGTG TGGAACGTGT AGCTGTTGAA GGTGGACTCT GTTACCATTG	60
AGGATGTTTG GAGGATGAGT ATGTGTGGCA GAGGCACACA TAAACAGGCA GAGACCCTTT	120
GGCCCTGCCT TTCTCCCCCA ACCCAAGGCT GACCTGTGTT CTCCCAGGTC TGGGATTCTA	180
AGTGACCTGC TCTGTGTTTG GTCTCTCTCA GGATGAGCAC AAGCCTGGGA GATGGCAGTG	240
ATGGAAATGG CCTGCCCAGG TGCCCCCTGGC TCAGCAGTGG GGCAGCAGAA GGAAGTCCCC	300
AAGCCAAAGG AGAAGACGCC GCCACTGGGG AAGAAACAGA GCTCCGTCTA CAAGCTTGAG	360
GCCGTGGAGA AGAGCCCTGT GTTCTGCGGA AAGTGGGAGA TCCTGAATGA CGTGATTACC	420
AAGGGCACAG CCAAGGAAGG CTCCGAGGCA GGGCCAGCTG CCATCTCTAT CATCGCCCAG	480
GCTGAGTGTG AGAATAGCCA AGAGTTCAGC CCCACCTTTT CAGAACGCAT TTTCATCGCT	540
GGGTCCAAAC AGTACAGCCA GTCCGAGAGT CTTGATCAGA TCCCCAACAA TGTGGCCCAT	600
GCTACAGAGG GCAAAATGGC CCGTGTGTGT TGGAAGGGAA AGCGTCGCAG CAAAGCCCGG	660
AAGAAACGGA AGAAGAAGAG CTCAAAGTCC CTGGCTCATG CAGGAGTGGC CTTGGCCAAA	720
CCCCTCCCCA GGACCCCTGA GCAGGAGAGC TGCACCATCC CAGTGCAGGA GGATGAGTCT	780
CCACTCGGCG CCCCATATGT TAGAAACACC CCGCAGTTCA CCAAGCCTCT GAAGGAACCA	840
GGCCTTGGGC AACTCTGTTT TAAGCAGCTT GGCGAGGGCC TACGGCCGGC TCTGCCTCGA	900
TCAGAACTCC ACAAAGTATG CAGCCCCCTG CAATGTCTGA ACCACGTGTG GAAACTGCAC	960
CACCCCCAGG ACGGAGGCCC CCTGCCCTG CCCACGCACC CCTTCCCCTA TAGCAGACTG	1020
CCTCATCCCT TCCCATTCCA CCCTCTCCAG CCCTGGAAAC CTCACCCTCT GGAGTCCTTC	1080
CTGGGCAAAC TGGCCTGTGT AGACAGCCAG AAACCCTTGC CTGACCCACA CCTGAGCAAA	1140
CTGGCCTGTG TAGACAGTCC AAAGCCCCTG CCTGGCCAC ACCTGGAGCC CAGCTGCCTG	1200
TCTCGTGGTG CCCATGAGAA GTTTTCTGTG GAGGAATACC TAGTGCATGC TCTGCAAGGC	1260
AGCGTGAGCT CAAGCCAGGC CCACAGCCTG ACCAGCCTGG CCAAGACCTG GGCAGCACGG	1320
GGCTCCAGAT CCCGGGAGCC CAGCCCCAAA ACTGAGGACA ACGAGGGTGT CCTGCTCACT	1380
GAGAACTCA AGCCAGTGGA TTATGAGTAC CGAGAAGAAG TCCACTGGGC CACGCACCAG	1440
CTCCGCCTGG GCAGAGGCTC CTTCCGAGAG GTGCACAGGA TGGAGGACAA GCAGACTGGC	1500
TTCCAGTGCG CTGTCAAAAA GGTGCGCCTG GAAGTATTTT GGGCAGAGGA GCTGATGGCA	1560
TGTGCAGGAT TGACCTCACC CAGAATTGTC CCTTTGTATG GAGCTGTGAG AGAAGGGCCT	1620
TGGGTCAACA TCTTCATGGA GCTGCTGGAA GGTGGCTCCC TGGGCCAGCT GGTCAAGGAG	1680

CAGGGCTGTC	TCCCAGAGGA	CCGGGCCCTG	TACTACCTGG	GCCAGGCCCT	GGAGGGTCTG	1740
GAATACCTCC	ACTCAGGAAG	GATTCTGCAT	GGGGACGTCA	AAGCTGACAA	CGTGCTCCTG	1800
TCCAGCGATG	GGAGCCACGC	AGCCCTCTGT	GACTTTGGCC	ATGCTGTGTG	TCTTCAACCT	1860
GATGGCCTGG	GAAAGTCCTT	GCTCACAGGG	GACTACATCC	CTGGCACAGA	GACCCACATG	1920
GCTCCGGAGG	TGGTGCTGGG	CAGGAGCTGC	GACGCCAAGG	TGGATGTCTG	GAGCAGCTGC	1980
TGTATGATGC	TGCACATGCT	CAACGGCTGC	CACCCCTGGA	CTCAGTTCTT	CCGAGGGCCG	2040
CTCTGCCTCA	AGATTGCCAG	CGAGCCTCCG	CCTGTGAGGG	AGATCCCACC	CTCCTGCGCC	2100
CCTCTCACAG	CCCAGGCCAT	CCAAGAGGGG	CTGAGGAAAG	AGCCCATCCA	CCGCGTGTCT	2160
GCAGCGGAGC	TGGGAGGGAA	GGTGAACCGG	GCACTACAGC	AAGTGGGAGG	TCTGAAGAGC	2220
CCTTGGAGGG	GAGAATATAA	AGAACCAAGA	CATCCACCGC	CAAATCAAGC	CAATTACCAC	2280
CAGACCCTCC	ATGCCCAGCC	GAGAGAGCTT	TCGCCAAGGG	CCCCAGGGCC	CCGGCCAGCT	2340
GAGGAGACAA	CAGGCAGAGC	CCCTAAGCTC	CAGCCTCCTC	TCCCACCAGA	GCCCCAGAG	2400
CCAAACAAGT	CTCCTCCCTT	GACTTTGAGC	AAGGAGGAGT	CTGGGATGTG	GGAACCCTTA	2460
CCTCTGTCCT	CCCTGGAGCC	AGCCCTGCC	AGAAACCCCA	GCTCACCAGA	GCGGAAAGCA	2520
ACCGTCCCGG	AGCAGGAACT	GCAGCAGCTG	GAAATAGAAT	TATTCCTCAA	CAGCCTGTCC	2580
CAGCCATTTT	CTCTGGAGGA	GCAGGAGCAA	ATTCTCTCGT	GCCTCAGCAT	CGACAGCCTC	2640
TCCCTGTGCG	ATGACAGTGA	GAAGAACCCA	TCAAAGGCCCT	CTCAAAGCTC	GCGGGACACC	2700
CTGAGCTCAG	GCGTACACTC	CTGGAGCAGC	CAGGCCGAGG	CTCGAAGCTC	CAGCTGGAAC	2760
ATGGTGCTGG	CCCGGGGGCG	GCCCACCGAC	ACCCCAAGCT	ATTTCAATGG	TGTGAAAGTC	2820
CAAATACAGT	CTCTTAATGG	TGAACACCTG	CACATCCGGG	AGTTCCACCG	GGTCAAAGTG	2880
GGAGACATCG	CCACTGGCAT	CAGCAGCCAG	ATCCCAGCTG	CAGCCTTCAG	CTTGGTCACC	2940
AAAGACGGGC	AGCCTGTTCG	CTACGACATG	GAGGTGCCAG	ACTCGGGCAT	CGACCTGCAG	3000
TGCACACTGG	CCCCTGATGG	CAGCTTCGCC	TGGAGCTGGA	GGGTCAAGCA	TGGCCAGCTG	3060
GAGAACAGGC	CCTAAECCTG	CCCTCCACCG	CCGGCTCCAC	ACTGCCGGAA	AGCAGCCTTC	3120
CTGCTCGGTG	CACGATGCTG	CCCTGAAAAC	ACAGGCTCAG	CCGTTCCCAG	GGGATTGCCA	3180
GCCCCCGGC	TCACAGTGGG	AACCAGGGCC	TCGCAGCAGC	AAGGTGGGGG	CAAGCAGAAT	3240
GCCTCCAGG	ATTTACACAC	TGAGCCCTGC	CCCACCCTGC	TGAAAAACA	TCCGCCACGT	3300
GAAGAGACAG	AAGGAGGATG	GCAGGAGTTA	CCTGGGGAAA	CAAAACAGGG	ATCTTTTTCT	3360
GCCCCTGCTC	CAGTCGAGTT	GGCCTGACCC	GCTTGATCA	GTGACCATT	GTTGGCAGAC	3420
AGGGGAGAGC	AGCTTCCAGC	CTGGGTCAGA	AGGGGTGGGC	GAGCCCTTCG	GCCCCTCACC	3480
CTCCAGGCTG	CTGTGAGAGT	GTCAAGTGTG	TAAGGGCCCA	AACTCAGGTT	CAGTGCAGAA	3540
CCAGGTCAGC	AGGTATGCCC	GCCCGTAGGT	TAAGGGGGCC	CTCTAAACCC	CTTGCCTGGC	3600
CTCACCTGGC	CAGCTCACCC	CTTTTGGGTG	TAGGGGAAAA	GAATGCCTGA	CCCTGGGAAG	3660
GCTCCCTGGT	AGAATACACC	ACACTTTTCA	GGTTGTTGCA	ACACAGGTCC	TGAGTTGACC	3720
TCTGGTTTCA	CCAAGGACCA	AAGAAGGTGT	GTAAGTGAAG	TGGTTCTCAG	TCCCCAGACA	3780
TGTGCCCCCT	TGCTGCTGGC	TACCACTCTT	CCCCAGAGCA	GCAGGCCCCG	AGCCCCTTCA	3840
GGCCCCAGCAC	TGCCCCAGAC	TCGCTGGCAC	TCAGTTCCCT	CATCTGTAAA	GGTGAAGGGT	3900

GATGCAGGAT ATGCCTGACA GGAACAGTCT GTGGATGGAC ATGATCAGTG CTAAGGAAAG 3960
 CAGCAGAGAG AGACGTCCGG CGCCCCAGCC CCACTATCAG TGTCCAGCGT GCTGGTTCCC 4020
 CAGAGCACAG CTCAGCATCA CACTGACACT CACCCTGCCC TGCCCCTGGC CAGAGGGTAC 4080
 TGCCGACGGC ACTTTGCACT CTGATGACCT CAAAGCACTT TCATGGCTGC CCTCTGGCAG 4140
 GGCAGGGCAG GGCAGTGACA CTGTAGGAGC ATAGCAAGCC AGGAGATGGG GTGAAGGGAC 4200
 ACAGTCTTGA GCTGTCCACA TGCATGTGAC TCCTCAAACC TCTTCCAGAT TTCTCTAAGA 4260
 ATAGCACCCC CTTCCCCATT GCCCCAGCTT AGCCTCTTCT CCCAGGGGAG CTAATCAGGA 4320
 CTCACGTAGC ATTAAATCAG CTGTGAATCG TCAGGGGGTG TCTGCTAGCC TCAACCTCCT 4380
 GGGGCAGGGG ACGCCGAGAC TCCGTGGGAG AAGCTCATT CCACATCTTG CCAAGACAGC 4440
 CTTTGTCCAG CTGTCCACAT TGAGTCAGAC TGCTCCCGGG GAGAGAGCCC CGGCCCCCAG 4500
 CACATAAAGA ACTGCAGCCT TGGTACTGCA GAGTCTGGGT TGTAGAGAAC TCTTTGTAAG 4560
 CAATAAAGTT TGGGGTGATG ACAAATGTTA AAAAAA 4596

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 7 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Dĺžka: 947 aminokyselín

(B) Typ: aminokyselina

(C) Vláknitosť: jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: proteín

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 7:

Met Ala Val Met Glu Met Ala Cys Pro Gly Ala Pro Gly Ser Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Gln Gln Lys Glu Leu Pro Lys Pro Lys Glu Lys Thr Pro Pro Leu
 20 25 30
 Gly Lys Lys Gln Ser Ser Val Tyr Lys Leu Glu Ala Val Glu Lys Ser
 35 40 45
 Pro Val Phe Cys Gly Lys Trp Glu Ile Leu Asn Asp Val Ile Thr Lys
 50 55 60
 Gly Thr Ala Lys Glu Gly Ser Glu Ala Gly Pro Ala Ala Ile Ser Ile
 65 70 75 80
 Ile Ala Gln Ala Glu Cys Glu Asn Ser Gln Glu Phe Ser Pro Thr Phe
 85 90 95
 Ser Glu Arg Ile Phe Ile Ala Gly Ser Lys Gln Tyr Ser Gln Ser Glu
 100 105 110
 Ser Leu Asp Gln Ile Pro Asn Asn Val Ala His Ala Thr Glu Gly Lys
 115 120 125
 Met Ala Arg Val Cys Trp Lys Gly Lys Arg Arg Ser Lys Ala Arg Lys
 130 135 140
 Lys Arg Lys Lys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Ala His Ala Gly Val Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Lys Pro Leu Pro Arg Thr Pro Glu Gln Glu Ser Cys Thr Ile
 165 170 175
 Pro Val Gln Glu Asp Glu Ser Pro Leu Gly Ala Pro Tyr Val Arg Asn
 180 185 190
 Thr Pro Gln Phe Thr Lys Pro Leu Lys Glu Pro Gly Leu Gly Gln Leu
 195 200 205
 Cys Phe Lys Gln Leu Gly Glu Gly Leu Arg Pro Ala Leu Pro Arg Ser
 210 215 220
 Glu Leu His Lys Leu Ile Ser Pro Leu Gln Cys Leu Asn His Val Trp
 225 230 235 240
 Lys Leu His His Pro Gln Asp Gly Gly Pro Leu Pro Leu Pro Thr His
 245 250 255
 Pro Phe Pro Tyr Ser Arg Leu Pro His Pro Phe Pro Phe His Pro Leu
 260 265 270
 Gln Pro Trp Lys Pro His Pro Leu Glu Ser Phe Leu Gly Lys Leu Ala
 275 280 285
 Cys Val Asp Ser Gln Lys Pro Leu Pro Asp Pro His Leu Ser Lys Leu
 290 295 300
 Ala Cys Val Asp Ser Pro Lys Pro Leu Pro Gly Pro His Leu Glu Pro
 305 310 315 320
 Ser Cys Leu Ser Arg Gly Ala His Glu Lys Phe Ser Val Glu Glu Tyr
 325 330 335
 Leu Val His Ala Leu Gln Gly Ser Val Ser Ser Ser Gln Ala His Ser
 340 345 350
 Leu Thr Ser Leu Ala Lys Thr Trp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Ser Arg
 355 360 365
 Glu Pro Ser Pro Lys Thr Glu Asp Asn Glu Gly Val Leu Leu Thr Glu
 370 375 380
 Lys Leu Lys Pro Val Asp Tyr Glu Tyr Arg Glu Glu Val His Trp Ala
 385 390 395 400
 Thr His Gln Leu Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg
 405 410 415
 Met Glu Asp Lys Gln Thr Gly Phe Gln Cys Ala Val Lys Lys Val Arg
 420 425 430
 Leu Glu Val Phe Arg Ala Glu Glu Leu Met Ala Cys Ala Gly Leu Thr
 435 440 445
 Ser Pro Arg Ile Val Pro Leu Tyr Gly Ala Val Arg Glu Gly Pro Trp
 450 455 460
 Val Asn Ile Phe Met Glu Leu Leu Glu Gly Gly Ser Leu Gly Gln Leu
 465 470 475 480
 Val Lys Glu Gln Gly Cys Leu Pro Glu Asp Arg Ala Leu Tyr Tyr Leu
 485 490 495
 Gly Gln Ala Leu Glu Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Arg Arg Ile Leu
 500 505 510
 His Gly Asp Val Lys Ala Asp Asn Val Leu Leu Ser Ser Asp Gly Ser
 515 520 525
 His Ala Ala Leu Cys Asp Phe Gly His Ala Val Cys Leu Gln Pro Asp
 530 535 540
 Gly Leu Gly Lys Ser Leu Leu Thr Gly Asp Tyr Ile Pro Gly Thr Glu
 545 550 555 560

Thr His Met Ala Pro Glu Val Val Leu Gly Arg Ser Cys Asp Ala Lys
 565 570 575
 Val Asp Val Trp Ser Ser Cys Cys Met Met Leu His Met Leu Asn Gly
 580 585 590
 Cys His Pro Trp Thr Gln Phe Phe Arg Gly Pro Leu Cys Leu Lys Ile
 595 600 605
 Ala Ser Glu Pro Pro Pro Val Arg Glu Ile Pro Pro Ser Cys Ala Pro
 610 615 620
 Leu Thr Ala Gln Ala Ile Gln Glu Gly Leu Arg Lys Glu Pro Ile His
 625 630 635 640
 Arg Val Ser Ala Ala Glu Leu Gly Gly Lys Val Asn Arg Ala Leu Gln
 645 650 655
 Gln Val Gly Gly Leu Lys Ser Pro Trp Arg Gly Glu Tyr Lys Glu Pro
 660 665 670
 Arg His Pro Pro Pro Asn Gln Ala Asn Tyr His Gln Thr Leu His Ala
 675 680 685
 Gln Pro Arg Glu Leu Ser Pro Arg Ala Pro Gly Pro Arg Pro Ala Glu
 690 695 700
 Glu Thr Thr Gly Arg Ala Pro Lys Leu Gln Pro Pro Leu Pro Pro Glu
 705 710 715 720
 Pro Pro Glu Pro Asn Lys Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ser Lys Glu Glu
 725 730 735
 Ser Gly Met Trp Glu Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Pro Ala Pro
 740 745 750
 Ala Arg Asn Pro Ser Ser Pro Glu Arg Lys Ala Thr Val Pro Glu Gln
 755 760 765
 Glu Leu Gln Gln Leu Glu Ile Glu Leu Phe Leu Asn Ser Leu Ser Gln
 770 775 780
 Pro Phe Ser Leu Glu Glu Gln Glu Gln Ile Leu Ser Cys Leu Ser Ile
 785 790 795 800
 Asp Ser Leu Ser Leu Ser Asp Asp Ser Glu Lys Asn Pro Ser Lys Ala
 805 810 815
 Ser Gln Ser Ser Arg Asp Thr Leu Ser Ser Gly Val His Ser Trp Ser
 820 825 830
 Ser Gln Ala Glu Ala Arg Ser Ser Trp Asn Met Val Leu Ala Arg
 835 840 845
 Gly Arg Pro Thr Asp Thr Pro Ser Tyr Phe Asn Gly Val Lys Val Gln
 850 855 860
 Ile Gln Ser Leu Asn Gly Glu His Leu His Ile Arg Glu Phe His Arg
 865 870 875 880
 Val Lys Val Gly Asp Ile Ala Thr Gly Ile Ser Ser Gln Ile Pro Ala
 885 890 895
 Ala Ala Phe Ser Leu Val Thr Lys Asp Gly Gln Pro Val Arg Tyr Asp
 900 905 910
 Met Glu Val Pro Asp Ser Gly Ile Asp Leu Gln Cys Thr Leu Ala Pro
 915 920 925
 Asp Gly Ser Phe Ala Trp Ser Trp Arg Val Lys His Gly Gln Leu Glu
 930 935 940
 Asn Arg Pro
 945

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 8 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Délka: 30 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitost': jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /desc = „oligonucleotide PCR primer“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 8:

CAGGATCCTC ATGGCTGCAG CTAGCGTGAC

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 9 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Délka: 32 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitost': jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /desc = „oligonucleotide PCR primer“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 9:

GGTCGACTTA GAHCCCTGTC AGGTCCACAA TG

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 10 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Délka: 24 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitost': jednovláknová

(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /desc = „oligonucleotide probe“

(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 10:

GATGCCATTG GGGATTTCCT CTTT

(2) Údaje o sekvencii SEQ ID NO: 11 :

(i) Charakteristika sekvencie:

(A) Délka: 24 párov báz

(B) Typ: nukleová kyselina

(C) Vlákňitost': jednovláknová

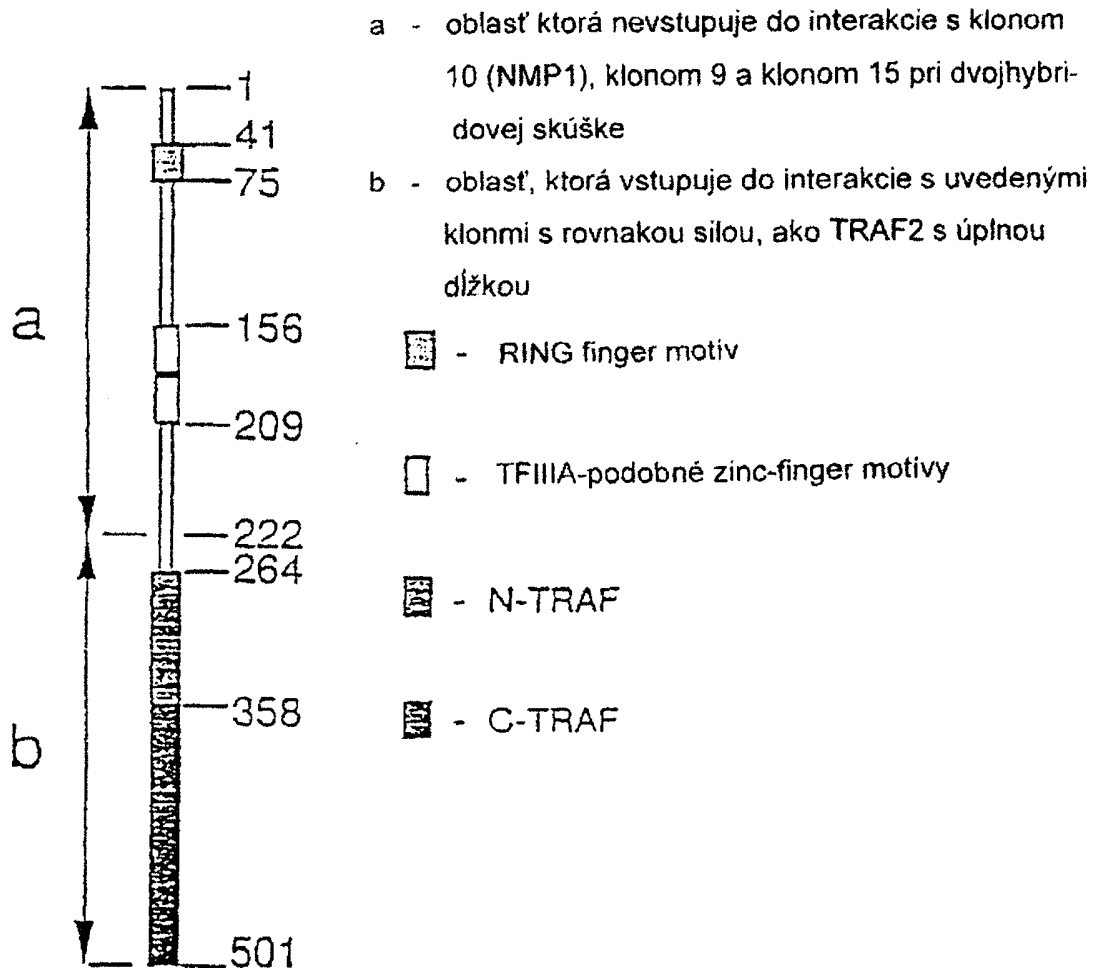
(D) Topológia: lineárna

(ii) Molekulový typ: iná nukleová kyselina

(A) Opis: /desc = „oligonucleotide probe“

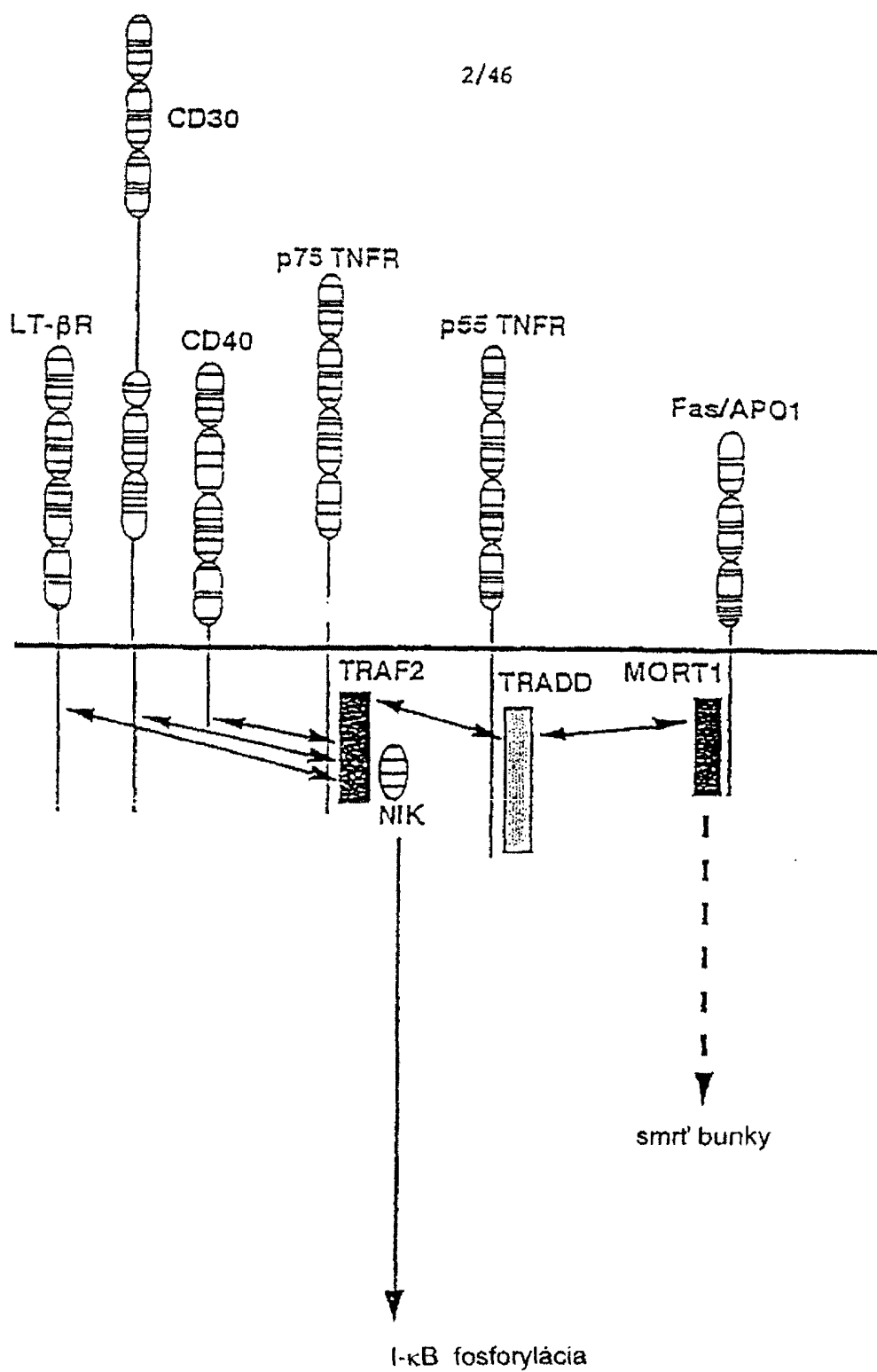
(xi) Opis sekvencie: SEQ ID No: 11:

CAGTAAAGAG GAAATCCCCA ATGG



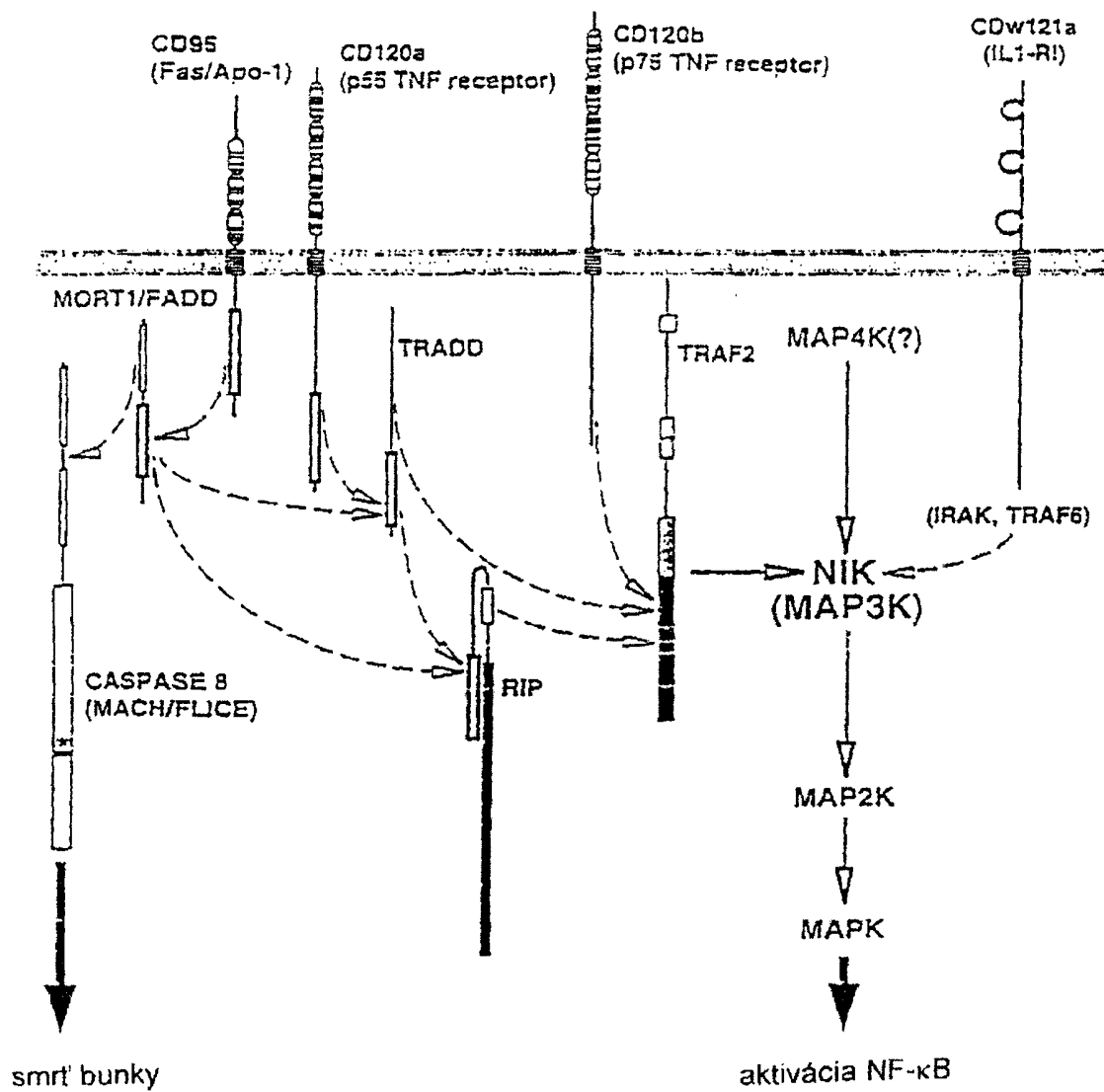
Obr. 1

2/46



OBR. 2a

3/46



OBR. 2b

4/46

Length: 1906 July 7, 1996 12:35 Type: N Check: 7122

1 CATTGGGTCA CGCGGTGGCG GCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCCGGGCTG
 51 CAGGAATTCG ATTCGAGGCC ACGAAGGCCG GCGGCGCGGC GCAGGCACCG
 101 GCCCCGGGGAN AGGChCCATG AGCGGATChC hGAACChATGA CAAAAGACAA
 151 TTTCTGCTGG AGCGACTGCT GGATGCAGTG AAACAGTGCC AGATCCGCTC
 201 TnGAGGGAGA AAGGAGATTG CCTCGGATTC CGACAGCAGG GTCACCTGTC
 251 TGTGTGCCCCA GTTTGAAGCC GTCCTGCAGC ATGGCTTGAA GAGGAGTCCA
 301 GGATTGGCAC TCACAGCGGC AGCGATCAAG CAGGCAGCGG GCTTTGCCAG
 351 CAAAACCGAA ACAGAGCCCCG TGTTCCTGGTA CTACGTGAAG GAGGTCTCA
 401 ACAAGCACGA GCTGCAGCGC TTCTACTCCC TCGGCCACAT CGCCTCAGAc
 451 gTGGGCCGGG GTCGGCGCTG GCTGcGCTGT GCCCTCAACG AACACTCCCT
 501 GGAGCGCTAC CTGCACChTGC TCCTGGCCGA CCGCTGCAGG CTGAGCACTT
 551 TTTATGAAGA CTGGTCTTTT GTGATGGaTG AAGAAAGGTC CAGTATGCTT
 601 CCTACCATGG CAGCAGGTCT GAACTCCATA CTCCTTGCGA TTAACATCGA
 651 CAACAAGGAT TTGAACGGGC AGAGTAAGTT TGCTCCCACC GTTTCAGACC
 701 TCTTAAAGGA GTCAACGCAG AACGTGACCT CCTTGCTGAA GGAGTCCACG
 751 CAAGGAGcGA GCAGCCTGTT CAGGGAGATC ACAGcCTcCT cTGCCGTcTC
 801 CATCcTCATC AAACCTGAAC AGGAGACCGA CCCTTGCCCTG TCGTGTCCAG
 851 GAATGTCAGT GCTGATGCCA AATGCAAAA GGAGCGGAAG AAGAAAAAGA

OBR. 3a

901 AAGTGACCAA CATAATCTCA TTTGATGATG AGGAAGATGA GCAGAACTCT
951 GGGGACGTGT TTAAAAAGAC ACCTGGGGCA GGGGAGAGCT CAGAGGACAA
1001 CTCCGACCGC TCCTCTGTCA ATATCATGTC CGCCTTTGAA AGCCCCCTCG
1051 GGCCTAACTC CAATGGAATC AGAGCAGCAA CTCATGGAAA ATTGATTCCC
1101 TGTCTTTGAA CGGGGAGTTT GGGTACCAGA AGCTTGATGT GAAAAGCATC
1151 GAtGAeGAAG ATyTGGATGA AAACGAAGAT GAcyTGTATG GAAACTCATC
1201 AGGAAGGAAG CACAGGGGCC ACTCGGAGTC GCCCGAGAAG CCACTGGAAG
1251 GGAACACCTy CCTCTCCcAG ATGCACAGCT GGyCtCCGCT GAAGyTyCTG
1301 CaCAaTGACT CCGACATCCT CTTCCTGTGTC AGTGGCGTGG yCTCCTACAG
1351 CCCAGCAGAT yCCCCCCTCG GAAGCCTGGA GAACGGGACA GGACCAGAGG
1401 ACCACGTTCT CCCGGATCCT GGACTTCGGT ACAGTGTGGA AGCCAGCTCT

OBR. 3b

1451 CCAGGCCACG GAAGTCCTCT GAGCAGCCTG TTACTTCTGC CTCAGTGCCA
1501 GAGTCCATGA CAATTAGTGA ACTGCGCCAG GCCACTGTGG CCATGATGAA
1551 CAGGAAGGAT GAGCTGGAGG AGGAGAACAG ATCACTGCGA AACCTGCTCG
1601 ACGGTGAGAT GGAGCACTCA GCCGCGCTCC GGCAAGAGGT GGACACCTTG
1651 AAAAGGAAGG TGGCTGAACA GGAGGAGCGG CAGGGCATGA AGGTCCAGGC
1701 GCTGGCCAGC TATCTTTGCT ATTTTGTGAG GAGATTCTAA CCCCACGTGA
1751 GAACCATGTG GTGGAGAAAT GGAGGGAGAG AGAAATCCAA CAGTTCCTGA
1801 TAGTCTCATT TGAGCTCCTG GATCCAGTCT TTCCTGAAGC TGTGTTTCCT
1851 CTGGACTTTT CATGTATGTG AGCCAATAAA TTGCTTTCAT TCCTTGAAAA
1901 AAAAAA

7/46

TRANSLATE of: 9hhh check: 7122 from: 1 to: 1906
generated symbols 1 to: 635.

9hhh.pep Length: 604 August 23, 1996 15:03 Type: P Check: 4554

```

1  XTGPGKXGXS GSXNDKROF LLERLLDAVK QCOIRFXGRK EIASDSDSRV
51  TCLCAQFEAV LQGLKRSRG LALTAAAIKQ AAGFASKTET EPVFWYYVKE
101 VLNKHELQRF YSLRHIASDV GAGRAWLRCA LNEHSLERYL HMLLADRCRL
151 STFYEDWSFV MDEERSSMLP TMAAGLNSIL FAINIDNKDL NGQSKFAPTV
201 SDLLKESTQN VTSLLKESTQ GVSSLFREIT ASSAVSILIK PEQETDFCLS
251 CPGMSVLMFN AKRSGRRGRK *PT*SHLMR KMSRTLGTCL KPHLGQGRAQ
301 RTTPTAPLSI SCFFLKAPSG LTFMESEQQL MEN*FFVFER GVWVFEA*CE
351 KHR**RCG*K RR*RVWALLR XEAQGPIGVA REATGREHLP LPDAQLGSAE
401 GAAQ*LKHPL PCQWRGLLOP SRCFFRKEGE RDRTRGPRSP GSWTSVQCGS
451 QLSRPRKSSZ QPVTSASVPE SMTISELRQA TVAMMNRKDE LEEENRSLRN
501 LLDGZEMESA ALRQEVDTLK RNVAEQEERQ GKKVQALASY LCYFVRRF*P
551 HVRTMWRNG GREKSNSS** SHLSSWIQSF LALCFLWTFH VCEPINCSES
601 LXXX

```

OBR. 3d

8/46

clone 10 Length: 2631 August 23, 1996 17:19 Type: N Check: 5107

```

1  CCCCcTcTcAC AGCcCAgGCC ATCCcAAGAGG GgCTGAGGAA AGAGCCCCATC
51  cACCGcGTGT cTGCAGcGGA GcTGGGAGGG AAGGTGAACC GGGcAcTACA
101 GCAAGTGGGA GGTcTGAAGA GcCCcTTGGAG GCGAGAAATAT AAAGAACCcAA
151 GAcATCCAc GcCAAAATCA GcCAAcTACC ACCAGAcCcT CcATGCCcAg
201 CCGAGAGAGc TtTcGCCAAG GcCCcAGGG CcCCGGCcAg CTGAGGAGAc
251 AACAggCAGA GcCCcTAAGc TCCAGCcTCC TcTCCcACCA GAGCCCCcAG
301 AGCCcAACAA GTcTCCcCCC ttGAcTttGA GcAAGGAGGA GTcTGGGATC
351 TGGGAACCCcT TAcCcTcTGT cTCCcTGGAG CcAGCCCCcTc CcAGAAACCC
401 CAGcTCACCA GAGcGGAAAG CAAGCcTCCc GGAGcAGGAA CTGCAGcAGc
451 TGGAAATAGA ATTATTCCTc AACAGCcTGT CcCAGcCATt TcTcTGGAG
501 GAGcAGGAGc AAATTCcTc GTGCcTCAGc ATCGAcAGCc TcTCCcTGTc
551 GGATGAcAGT GAGAAGAc CAtCAAAAGc CTCTcAAAGc TCGcGGGAcA
601 CCcTGAGcTc AGGcGTAcAc TCcTGGAGcA GcCAGcCCcA GgTcGGAAGc
651 TCCAGcTGA AcATGcTGT GcCCcGGGg GgCCcAcCc ACACCCcAAG
701 CTATTTCAAT GGTGTGAAG TCCAAATAcA GTCTcTTAAT GGTGAACAcC
751 TGcAcATCCG GgAGTTCcAc CGGGTcAAAG TGGGAGAcAT CCGcAcTGGc
801 ATcAGcAGCc AGAcCCcAGc TCCAGCcTTC AGcTTGGTCA' CcAAAGAcGG
851 GcAGCcTGTt CGcTAcGAcA TGGAGGTcCc AGAcTcGGGc ATCGAcCTGc
901 AGTGCACAcT GcCCcCTGAT GGCAGcTTCG CCTGGAGcTG GAGGGTCAAG
951 CATGGCCAGc TGGAGAcAG GcCCcTAACc TCCcCTCCAc CCGCGGcTCC
1001 AcAcTGCcCG aAAGcAGCcT TCcTGCcTGG tGCACGATGc TGCCcTGAaA
1051 AcAcAGGcTc AGCcGTTCcC AgGGgATyTG .CCAGcCCcC cGGcTcAcA
1101 G.tGGGAAcC AGGGcTcG. CAGc.AGc.A AGGT.gGGG CAAGc.AGAA
1151 TGcTCCcAG GATTTCAcA. CcTGAGCcC. TGCCcCA.cC cTGcTGAaDA
1201 AAAcAyT.cC GcAcGtGAA GAgAcAGaAG GAGGATGG.c AGGAgTt..A
1251 CcTygGGGAa aCaAAAcAGg gaTcTt.tT cTGcCCcTGC TCCAGT.cGA

```

OBR. 4a

9/46

1301 gttGGCCCTG. ACCCGcTTGG A.TCAgtGAC CATTtGcTGG CAGA.CAGGG
 1351 GagAgCAGcT TCCAGCctGG gTCAGAAGGG GTGGGcGAGC CctTeGGCCC
 1401 cTcAcCCT.c cAGGcTgGTG tG.AGAGTGT CAAGTGTGTa AGGG.CCCAA
 1451 A.cTcAGG.T TCAGTGCAGA ACCAgGT.CA GCAGGTATGC CCGCCCG.TA
 1501 GGTAA..GG GGGCCcTcT. AAGCCCTTG cCT.GGCCCT. CAGCT.GGCC
 1551 AGCTCA.CCC cTTTtGGGTG TAGGGCAAAA GAATGCCTCA CCCTGGGAAG
 1601 GCTWCCCTGG TAGAATACAC CACACTTTTC AGSTTGTtGC AACACAGSTC
 1651 CTGAGTTGAC CTCTGTtTCA GCCAAGGACC AAAGAAGSTG TGTAAGTGA
 1701 GTGGTTCTCA gT.CCCCAgA CATgTgCCCC TTTGCTGCTG GCTACCCTC
 1751 TTCCCCAgAg CAGCAGGccc CgAgCCCCCTT CAGGcCCAgC AcTGeCCCAG
 1801 AcTcGcTGGC acTCAgTTCC CTCATCTGTa AAGGTGAAGG GTGATGCAGG

 1851 ATATGCCTGA CAGGAACAGT CTGTGGAtGG AcATGATCAg TcCT.AAGG.
 1901 AAAGCAGcAG AGaGAGAGGy TcGGGGCCCC CAg.CCCCCAc T.ATCAGTgT
 1951 .CCAgCGTGC T.GGTT.CCC CAg.AGCACA GcT.CAg.CA TcA.CACTGA
 2001 CACT.CAcCC T.GCCcTGGC cCT.GGCCA. GAgGGTACTG CCG.ACGGCA
 2051 CTTTGCAC.T CTGATG.ACC TCAAAGCACT TTcATGgCT. GccCTc...G
 2101 GCAGGG.CAG GG.CAGGG.C AgTGAcA.CT GTAgG.AGCA TA.gCAA.GC
 2151 CAgGAGATGG GGTG.AAGGG A.CACAGTCT TGAGCTGTCC A.CATGCATG
 2201 TGAcT.CCTC AAAcCTcTT. .CCAG.ATTT CTCTAAGAAT AGCA.CCCCC
 2251 TT.CCCCATT GCCCCAGCTT AgCCTCTTCT CCCAGGGGAG CTa.CTCAgG
 2301 ACTCACGTAg CATTAAATCA GCTGTG.AAT CGTCAGGGGG TGTCTGCTAg
 2351 CCTCAACCTC CTGGGGCaGG GGACgCCGAg ACTCCGTGGG AgAAgCTCAT
 2401 TcCcCaTCT TGCCAAgACA gCCTTT.GTC CAgCTGTCCA CATTGAgtCA
 2451 gACTGCTCCC GGGGAgAgAg cCCCCGcCCC CAgCACATAA AGAACTGCAG
 2501 CCTTGSTACT GCAGACTCTG GGTtGTAGAG AACTCTTTGT AAGCAATAAA
 2551 GTTTGGGSTG ATGACAAATG TTAaaaaaAG GCCTTCGTGG CCTCGAATCA
 2601 AGCTTATCGA TACCSTCGAC CTCGAGGGGG G

OBR. 4b

10/46

Length: 1253 July 10, 1996 clone15

```

1  CATTGGAGTC ACBGGGTGGC GCGGCTCTAG AATAGTGGAT CCCCCGGCTg
51  CA.GGAATTC GATTCGAGcC CACGAAGGCC CTTTCTTCTG TGGTCGCGGC
101 ACGTTTACaG CCGCAAGCac CCAGCGGCAG CTGAAGGAGG CTTTGTAgAG
151 GCTCCTgCCC CAGGTGGAGG CGSCCCGCAa GGCCATCCgC GCGGCTCAGG
201 TGGAGCGCTA TGTGCCCGAA CACGAGCGAT GCTGCTGGTG CCTGTGCTGC
251 GGCTGTGAGG TCGGGGAACA CCTGAGCCAT GGAAACCTGA CGGTGCTGTA
301 CGGGGGgCTG CTGGAGCAtC TGGCCAGCCC AGAGCACAAG AAAGCAACCA
351 ACAAATTCTG GTGGGAGAAC AAAGCTGAGG TCCAGATGAA AGAGAAGTTT
401 CTGGTCACTC CCCAGGATTA TGCGCGATTc AAGAAATCCA TGGTGAAAGG
451 TTTGGATTCC TATGAAGAAA AGGAGGATAA AGTGATCAAG GAGgTGgCAG
501 CTCAGATCCG TGgGGTGGAg CAGAgCCGAC AGGAggTGgT TCGGtCTGTc
551 TTAGAgCctC AGGCAGTGcc AGaCCcAGAA GAGGGcTCTT CAGCACCTAG
601 AAGCTGGAAA GGGATGAACA GCCAAGTAGc TTCCAGCTTA CAGCAGCCCT
651 CAAATTTGGA CCTGCCACCA GCTCCAGAGC TTGACTGGAT GGAGrCAGGA
701 CCATCTCTGA CATTCATTGG CCATCAGGAT ATACCAGGAG TTGGTACAT
751 CCACTCAGGT GCCACACCTC CCTGGATGAT CCAAGATGAA GAATACATTG
801 CTGGGAACCA AGAAATAGGA CCATCCTATG AAGAATTTCT TAAAGAAAAG
851 GAAAAACAGA AGTTGAAAAA ACTcCCCCCA GACCGAGTTG GGGCCAACCT
901 TGATCACAGC TCCAGGACCA GTGCAGGCTG GCTGCCCTCT TTTgGGcCGC
951 GTCTGGAATA ATGGACGCCG CTGGCAGTCC AGACATCAAC TcCAAAACTG
1001 AAGCTGCAGC AATGAAGAAG CAGTCACATA CAGAAAAAAG CTAATCATGC
1051 TCTCTACCAA CTACCATGAG GCTAAAAGCC AAAGTCAACC AAACCCCTAT
1101 TATACCTTCC ACCCAAATTC TTTATCATTG TCTTTCTTAG GAAACAGACA
1151 TACTCATTCa TTTGATTtAA TAAAGTTtTA TTTTTCGGCC TTCGTGGCCT
1201 CGAATCAAGC TTATCGATAC CGtCGACCTC GAGGGGGGGG CGTACCCACT
1251 TTT

```

OBR. 5a

11/46

TRANSLATE of: 15cc check: 9389 from: 2 to: 1253
generated symbols 1 to: 417.

15cc.pep Length: 417 August 23, 1996 14:32 Type: P Check: 7921

1 IGVTRWRRSR IVDPRAXNS IRAHEGPFPC GRGTFTAAS QRQLKEAFER
51 LLPQVEAARK AIRAAQVERY VPEHERCCWC LCCGCEVREH LSHGNLTVLY
101 GGLLEHLASP EHGATNKFW WENKAQVQMK EKFLVTFQDY ARFKKSMVKG
151 LDSYEEKEDK VIREMAAQIR EVEQSRQEVV RSVLEPQAVP DPEEGSSAPR
201 SWKGMNSQVA SSLQQPSNLD LPPAPELDWM ETG7SLTFIG HQDIFGVGNI
251 HSGATPFWMI QDEEYIAGNQ ETG7SYEEFL KEKERQKLXK LPPDRVGANF
301 DHSSRTSAGW LPSFGPRLE* WTPLAVQTST PKLKLOQ*RS SHIQKKANHA
351 LYQLP*G*KP KSTKPLLYLP PKFFLIIVFLR KQYSFI*FN KVLFFGLAGL
401 ESSLSIPSTS RGGATHF

OBR. 5b

12/46

1 AGC GGG GGG ACT GTG CCG TGT GGA ACG TGT AGC TGT TGA AGG TGG ACT CTG TTA CCA TTG
 31
 51 AGG ATG TTT GGA GGA TGA GTA TGT GTG GCA GAG GCA CAC ATA AAC AGG CAG AGA CCC TTT
 91
 121 GCC CCT GCC TTT CTC CCC CNA CCC AAG GCT GAC CTG TGT TCT CCC AGG TCT GGG ATT CTA
 151
 181 AGT GAC CTG CTC TGT GTT TGG TCT CTC TCA GGA TGA GCA CAA GCC TGG GAG ATG GCA GTG
 211
 241 ATG GAA ATG GCC TGC CCA GGT GCC CCT GGC TCA GCA GTG GGG CAG CAG AAG GAA CTC CCC
 271
 301 AAG CCA AAG GAG AAG ACG CCG CCA CTG GGG AAG AAA CAG AGC TCC GTC TAC AAG CTT GAG
 331
 361 GCC GTG GAG AAG AGC CCT GTG TTC TGC GGA AAG TGG GAG ATC CTG AAT GAC GTG ATT ACC
 391
 421 AAG GGC ACA GCC AAG GAA GGC TCC GAG GCA GGG CCA GCT GCC ATC TCT ATC ATC GCC CAG
 451
 481 GCT GAG TGT GAG AAT AGC CAA GAG TTC AGC CCC ACC TTT TCA GAA CGC ATT TTC ATC GCT
 511
 541 GGG TCC AAA CAG TAC AGC CAG TCC GAG AGT CTT GAT CAG ATC CCC AAC AAT GTG GCC CAT
 571

OBR. 6a

13/46

601 CCT ACA GAG GGC AAA ATG GCC CGT GTG TGT TGG AAG GGA AAG CGT CGC AGC AAA GCC CGG
 A T E G K M A R V C W K G K R R S K A R
 661 AAG AAA CGG AAG AAG AAG AGC TCA AAG TCC CTG GCT CAT GCA GGA GTG GCC TTG GCC AAA
 K K R K K K S S K S L A H A G V A L A K
 721 CCC CTC CCC AGG ACC CCT GAG CAG GAG AGC TGC ACC ATC CCA GTG CAG GAG GAT GAG TCT
 P L P R T P E Q E S C T I P V Q E D E S
 781 CCA CTC GGC GCC CCA TAT GTT AGA AAC ACC CCG CAG TTC ACC AAG CCT CTG AAG GAA CCA
 P L G A P Y V R N T P Q F T K P L K E P
 841 GGC CTT GGG CAA CTC TGT TTT AAG CAG CTT GGC GAG GGC CTA CGG CCG GCT CTG CCT CGA
 G L G Q L C F K Q L G E G L R P A L P R
 901 TCA GAA CTC CAC AAA CTG ATC AGC CCC TTG CAA TGT CTG AAC CAC GTG TGG AAA CTG CAC
 S E L H K L I S P L Q C L N H V W K L H
 961 CAC CCC CAG GAC GGA GGC CCC CTG CCC CTG CCC AGC CAC CCC TTC CCC TAT AGC AGA CTG
 H P Q D G G P L P L P T H P F P Y S R L
 1021 CCT CAT CCC TTC CCA TTC CAC CCT CTC CAG CCC TGG AAA CCT CAC CCT CTG GAG TCC TTC
 P H P F P F H P L Q P W K P H P L E S F
 1081 CTG GGC AAA CTG GCC TGT GTA GAC AGC CAG AAA CCC TTG CCT GAC CCA CAC CTG AGC AAA
 L G K L A C V D S Q K P L P D P H L S K
 1141 CTG GCC TGT GTA GAC AGT CCA AAG CCC CTG CCT GGC CCA CAC CTG GAG CCC AGC TGC CTG
 L A C V D S P K P L P G P H L E P S C L
 1201 TCT CGT GGT GCC CAT GAG AAG TTT TCT GTG GAG GAA TAC CTA GTG CAT GCT CTG CAA GGC
 S R G A H E K F S V E E Y L V H A L Q G
 1261 AGC GTG AGC TCA AGC CAG GCC CAC AGC CTG ACC AGC CTG GCC AAG ACC TGG GCA GCA CGG
 S V S S S Q A H S L T S L A K T W A A R

OBR. 6b

14/46

1321 GGC TCC AGA TCC CGG GAG CCC AGC CCC AAA ACT GAG GAC AAC GAG GGT GTC CTC CTC ACT
 G S R S R E P S P K T E D N E G V L L T
 1381 GAG AAA CTC AAG CCA GTG GAT TAT GAG TAC CGA GAA GTC CAC TGG GCC ACG CAC CAG
 E K L K P V D Y E Y R E E V H N A T H Q
 1441 CTC CGC CTG GGC AGA GGC TCC TTC GGA GAG CTG CAC AGG ATG GAG GAC AAG CAG ACT GGC
 L R L G R G S F G E V H R M E D K Q T G
 1501 TTC CAG TGC GCT GTC AAA AAG GIG OSC CTG GAA GTA TTT CCG GCA GAG GAG CTG ATG GCA
 F Q C A V K K V R L E V F R A E E L M A
 1561 TGT GCA GGA TTG ACC TCA CCC AGA ATT GTC CCT TTG TAT GGA GCT GTC AGA GAA GGG CCT
 C A G L T S P R I V P L Y G A V R E G P
 1621 TGG GTC AAC ATC TTC ATG GAG CTG CTG GAA GGT GGC TCC CTG GGC CAG CTG GTC AAG GAG
 W V N Y F M E L L E G G S L G Q L V K E
 1681 CAG GGC TGT CTC CCA GAG GAC CGG GCC CTG TAC TAC CTG GGC CAG GCC CTG GAG GGT CTG
 Q G C L P E D R A L Y Y L G Q A L E G L
 1741 GAA TAC CTC CAC TCA CGA AGG ATT CTG CNT GGG GAC GTC AAA GCT GAC AAC GTG CTC CTG
 E Y L R S R I L H G D V K A D N V L L
 1801 TCC AGC GAT GGG AGC CAC GCA GCC CTC TGT GAC TTT GGC CAT GCT GTG TGT CTT CAA CCT
 S S D G S H A A L C D F G H A V C L Q P
 1861 GAT GGC CTG GGA AAG TCC TTG CTC ACA GGG GAC TAC ATC CCT GGC ACA GAG ACC CAC ATG
 D G L G K S L L T G D Y I P G T E T H N
 1921 GCT CCG GAG GTG CTG GGC AGG AGC TCC GAC GCC AAG GTG GAT GTC TGG AGC AGC TGC
 A P E V V L G R S C D A K V D V W S S C

OBR. 6c

1981 TGT ATG ATG CTG CAC ATG CTC AAC GGC TGC CAC CCC TGG ACT CAG TTC TTC CGA GGG CCG
 C M H L H H L N G C H P 2011
 2041 CTC TGC CTC AAG ATT GCC AGC GAG CCT CCG CCT GTG AGG GAG ATC CCA CCC TCC TCC GCC
 L C L K I A S E P P P V R E I P P S C A 2071
 2101 CCT CTC ACA GCC CAG GCC ATC CAA GAG GGG CTG AGG AAA GAG CCC ATC CAC CGC GTG TCT
 P L T A Q A I Q E G L R K E P I H R V S 2131
 2161 CCA GCG GAG CTG GGA GGC AAG GTG AAC CCG GCA CTA CAG CAA GTG GGA GGT CTG AAG AGC
 A A E L C G K V N R A L Q Q V G C L K S 2191
 2221 CCT TGG AGG GGA GAA TAT AAA GAA CCA AGA CAT CCA CCG CCA AAT CAA GCC AAT TAC CAC
 P W R G E Y K E P R H P P P N Q A N Y H 2251
 2281 CAG ACC CTC CAT GCC CAG CCG AGA GAG CTT TCG CCA AGG GCC CCA GGG CCC CGG CCA GCT
 Q T L H A Q P R E L S P R A P G P R P A 2311
 2341 GAG GAG ACA ACA GGC AGA GCC CCT AAG CTC CAG CCT CCT CTC CCA CCA GAG CCC CCA GAG
 E E T T G R A P K L Q P P L P P E P P E 2371
 2401 CCA AAC AAG TCT CCT CCC TTG ACT TTG AGC AAG GAG GAG TCT GGG ATG TGG GAA CCC TTA
 P N K S P P L T L S K E E S G M W E P L 2431
 2461 CCT CTG TCC TCC CTG GAG CCA GCC CCT GCC AGA AAC CCC AGC TCA CCA GAG CGG AAA GCA
 P L S S L E P A P A R N P S S P E R K A 2491
 2521 ACC GTC CCG GAG CAG GAA CTG CAG CAG CTG GAA ATA GAA TTA TTC CTC AAC AGC CTG TCC
 T V P E Q E L Q Q L E I E L F L N S L S 2551
 2581 CAG CCA TTT TCT CTG GAG GAG CAG CAA ATT CTC TCG TGC CTC AGC ATC GAC AGC CTC
 Q P F S L E E Q E Q I L S C L S I D S L 2611
 2641 TCC CTG TCG GAT GAC AGT GAG AAG AAC CCA TCA AAG GCC TCT CAA AGC TCG CGG GAC ACC
 S L S D S E K N P S K A S Q S S R D T 2671
 2701 CTG AGC TCA GGC GTA CAC TCC TGG AGC AGC CAG GCC GAG GGT CCA AGC TCC AGC TGG AAC
 L S S G V H S W S S Q A E A R S S S W H 2731
 2761 ATG CTG CTG GCC CGG GGG CGG CCC ACC GAC ACC CCA AGC TAT TTC AAT GGT GTG AAA GTC
 M V L A R G R P T D T P S Y F N G V K 2791

OBR. 6d

16/46

2821 CAA ATA CAG TCT CTT AAT GGT GAA CAC CTG CAC 2851 CCG GAG TTC CAC CGG GTC AAA GTG
 Q I Q S L N G E H L H I R E F H R V K V
 2881 GGA GAC ATC GCC ACT GGC ATC AGC AGC CAG ATC CCA GCT GCA GCC TTC AGC TTG GTC ACC
 G D I A T G I S S Q I P A A A F S L V T
 2941 AAA GAC GGG CAG CCT GTT CGC TAC GAC ATG GAG GTG CCA GAC TCG GGC ATC GAC CTG CAG
 K D G Q P V R Y D M E V P D S G I D L Q
 3001 TGC ACA CTG GCC CCT GAT GGC AGC TTC GCC TGG AGC TGG AGG GTC AAG CAT GGC CAG CTG
 C T L A P D G S F A W S W R V K H G Q L
 3061 GAG AAC AGG CCC TAA CCC TGC CCT CCA CCG CCG GCT CCA CAC TGC CCG AAA GCA GCC TTC
 E N R P *
 3121 CTG CTC GGT GCA CGA TGC TGC CCT GAA AAC ACA GGC TCA GCC GTT CCC AGG GGA TTG CCA
 3151
 3181 GCC CCC CGG CTC ACA GTG GGA ACC AUG GCC TCG CAG CAG CAA GGT GGG GGC AAG CAG AAT
 3211
 3241 GCC TCC CAG GAT TTC ACA CCT GAG CCC TGC CCC ACC CTC CTG AAA AAA CAT CCG CCA CGT
 3271
 3301 GAA GAG ACA GAA GGA GCA TGG CAG GAG TTA CCT GGG GAA ACA AAA CAG GGA TCT TTT TCT
 3331
 3361 CCC CCT GCT CCA GTC GAG TTG GCC TAA CCC GCT TGG ATC AGT GAC CAY TTG TTG GCA GAC
 3391
 3421 AGG GGA GAG CAG CTT CCA GCC TGG GTC AGA AGG GGT GGG CGA GCC CTT CGG CCC CTC ACC
 3451

OBR. 6e

17/46

3481 CTC CAG GCT GCT GTG AGA GTG TCA AGT GTG TAA GGG CCC AAA CTC AGG TTC ACT GCA GAA 3511
 3541 CCA GGT CAG CAG GTA TGC CCG CCC GTA GGT TAA GGG GGC CCT CTA AAC CCC TTG CCT GGC 3571
 3601 CTC ACC TGG CCA GCT CAC CCC TTT TGG GTG TAG GGG AAA AGA ATG CCT GAC CCT GGG AAG 3631
 3661 GCT CCC TGG TAG AAT ACA CCA CAC TTT TCA GGT TGT TGC AAC ACA GGT CCT GAG TTG ACC 3691
 3721 TCT GGT TCA GCC AAG GAC CAA AGA AGG TGT GTA ACT GAA GTG GTT CTC AGT CCC CAG ACA 3751
 3781 TGT GCC CCT TTG CTG CTG GCT ACC ACT CTT CCC CAG AGC AGC AGG CCC CGA GCC CCT TCA 3811
 3841 GGC CCA GCA CTG CCC CAG ACT CGC TGG CAC TCA GTT CCC TCA TCT GTA AAG GTG AAG GGT 3871
 3901 GAT GCA GGA TAT GCC TGA CAG GAA CAG TCT GTG GAT GGA CAT CAT CAG TCC TAA GCA AAG 3931
 3961 CAG CAG AGA GAG ACG TCC GGC GCC CCA GCC CCA CTA TCA GTG TCC AGC GTG CTG GTT CCC 3991
 4021 CAG AGC ACA GCT CAG CAT CAC ACT GAC ACT CAC CCT GCC CTG CCC CTG GCC AGA GGG TAC 4051
 4081 TGC CGA CCG CAC TTT GCA CTC TGA TGA CCT CAA AGC ACT TTC ATG GCT GCC CTC TGC CAG 4111

OBR. 6f

18/46

4141 GGC AGG GCA GGG CAG TGA CAC TGT AGG AGC ATA GCA ACC CAG GAG ATG GGG TGA AGG GAC 4171
 4201 ACA GTC TTG AGC TGT CCA CAT GCA TGT GAC TCC TCA AAC CTC TTC CAG ATT TCT CTA AGA 4231
 4261 ATA GCA CCC CCT TCC CCA TTG CCC CAG CTT AGC CTC TTC TCC CAG GGG AGC TAC TCA GGA 4291
 4321 CTC ACG TAG CAT TAA ATC AGC TGT GAA TCG TCA GGG GGT GTC TGC TAG CCT CAA CCT CCT 4351
 4381 GGG GCA GGG GAC GCC GAG ACT CCG TGG GAG AAG CTC ATT CCC ACA TCT TGC CAA GAC AGC 4411
 4441 CTT TGT CCA GCT GTC CAC ATT GAG TCA GAC TGC TCC CGG GGA GAG AGC CCC GGC CCC CAG 4471
 4501 CAC ATA AAG AAC TGC AGC CTT GGT ACT GCA GAG TCT GGG TTG TAG AGA ACT CTT TGT AAG 4531
 4561 CAA TAA AGT TTG GGG TGA TGA CAA ATG TTA AAA AAA 4596

OBR. 6g

19/46

[illegible]

OBR. 7a

OBR. 7b

21 / 46

[illegible]

OBR. 7c

OBR. 7d

OBR. 7e

OBR. 7f

OBR. 7g

68

OBR. 7i

OBR. 7j

OBR. 7k

OBR. 71

OBR. 7m

OBR. 7n

OBR. 70

OBR. 7p

S3	12	E	D	L	L	N	H	N	V	S	E	V	D	M	N	L	Y	A	S	E	P	A	V	E	44
S4	12	E	D	L	L	N	K	N	V	S	D	V	D	M	N	L	Y	A	S	E	P	A	V	E	44
S9	270	H	P	L	E	S	F	G	K	L	A	C	V	S	Q	K	P	L	E	P	D	P	H	S	310
S7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	H	T	S	L	E	A	P	P	N	L	E	S	G	29
S2	351	Q	V	L	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	P	E	D	N	S	P	S	E	367
S6	369	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	P	E	D	N	S	P	S	E	381
S8	1037	Q	N	L	E	K	E	P	R	A	N	D	K	P	T	E	G	I	A	S	P	I	S	L	1059
S1	336	K	C	K	E	K	M	E	A	E	E	E	A	L	A	A	M	A	M	S	A	S	Q	D	368
S5	932	E	L	K	E	R	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	V	O	M	S	948

35/46	74	74	343	56	379	392	1102	390	981
45	45	311	24	368	302	1070	369	948	
s3	s4	s9	s7	s2	s6	s8	s1	s5	
S	S	K	V	S	S	S	Q	D	
L	L	P	R	P	S	P	V	M	
M	M	R	R	S	S	K	E	V	
T	T	R	R	S	S	P	E	N	
M	M	R	R	S	S	P	E	N	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
B	B	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	
C	C	P	P	S	S	K	E	V	
D	D	P	P	S	S	K	E	V	
S	S	P	P	S	S	K	E	V	
N	N	P	P	S	S	K	E	V	

OBR. 7q

36/46

S3	75	S V R Y G T V E D I	-	A F A N H I S N T T K H S Y R C H P	-	-	103
S4	75	S V R Y G T V E D I	-	A F A N H I S N T T K H S Y R C H P	-	-	103
S9	344	S V S S Q A H S I	-	T S A K T W A A R G S R S R E P S B K T E	-	-	375
S7	57	S J R K S S I G I E S	K A H	V P A L P S I S K A E L P A K A R K D	-	-	89
S2	380	-	-	N T L E E D T D D O S I	-	-	392
S6	393	-	-	H D F F G E D S D I V S L P I K I A T P	-	-	412
S8	1103	G K N K P I N Q A K T	P K R T	I R T I A H E A S L A R K N S V	-	-	1135
S1	391	-	-	T K A K Q P Y R E D A E	-	-	402
S5	982	E I N S R I R L E A I	K I T I E K T M K R N P R Q M G K V L D A T D	-	-	-	1014
S3	104	Q E S G L L N M	-	-	V I S P Q N G R Y Q I D S D V L L V R	-	131
S4	104	Q E S G L L N M	-	-	V I T P Q N G R Y Q I D S D V L L V R	-	131
S9	376	D N E G V L L T E	-	-	K I P V D - M E Y R E E V H W A H	-	401
S7	90	D T P P I	-	-	-	-	94
S2	393	-	-	-	-	-	393
S6	413	K N	-	-	-	-	414
S8	1136	K L K R O N T K M W G T R M V E	V T E N H M V S I N K A K N S K G	-	-	-	1168
S4	403	-	-	-	-	-	403
S5	1045	Q G N K Y L L S L	-	-	-	-	1024

OBR. 7r

37/46

S3	132	W	K	L	T	Y	R	S	I	G	S	G	F	V	P	R	G	A	F	G	K	V	V	L	A	Q	D	M	K	I	K	C	H	M	164	
S4	132	W	K	L	T	Y	R	N	I	G	S	D	F	I	P	R	G	A	F	G	K	V	V	L	A	Q	D	M	K	I	K	C	H	M	164	
S9	402	H	Q	L	R	-	-	-	-	-	-	-	-	L	G	R	G	S	F	G	K	V	V	L	A	Q	D	M	K	I	K	C	H	M	426	
S7	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	122		
S2	394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	420		
S6	415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	412		
S8	1169	E	Y	K	E	F	A	W	M	K	G	E	M	I	G	K	G	S	F	G	K	V	V	L	A	Q	D	M	K	I	K	C	H	M	1201	
S1	403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	429		
S5	1028	S	N	V	S	M	R	W	Q	K	R	S	F	I	G	G	G	A	F	G	K	V	V	L	A	Q	D	M	K	I	K	C	H	M	1060	
S3	165	A	C	K	L	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169	
S4	165	A	C	K	L	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	169	
S9	427	A	V	K	K	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	431	
S7	123	A	V	K	K	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	127	
S2	421	A	V	K	K	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	425	
S6	443	V	K	Q	V	E	I	K	N	N	I	G	V	P	T	D	N	K	Q	A	N	S	D	E	N	N	E	Q	E	E	Q	Q	Q	Q	Q	475
S8	1202	A	V	K	K	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1207	
S1	430	A	V	K	K	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	436	
S5	1061	A	V	K	K	V	E	I	K	N	N	I	G	V	P	T	D	N	K	Q	A	N	S	D	E	N	N	E	Q	E	E	Q	Q	Q	Q	1068

OBR. 7s

OBR. 71

39/46

S3	215	VL	ES	CG	PM	RE	FE	WV	TK	HV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	246
S4	215	VL	ES	CG	PM	RE	FE	WV	TK	HV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	246
S9	477	LS	QOL	VKE	GL	PM	RE	WV	TK	HV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	508
S7	186	LS	QOL	VKE	GL	PM	RE	WV	TK	HV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	217
S2	484	LS	QOL	VKE	GL	PM	RE	WV	TK	HV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	515
S6	542	SS	ML	NX	GR	FE	ES	FT	RQ	IV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	573
S8	1265	VG	SL	RM	YV	GR	FE	FT	RQ	IV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	1296
S1	491	VA	HL	LS	KY	GR	FE	FT	RQ	IV	LV	KG	DL	FE	LI	SS	522
S5	1120	LA	SL	LD	-	HG	RI	ED	EM	VT	QIV	Y	FE	LI	SS	1151	
S3	247	KK	VV	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	275	
S4	247	KK	VV	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	275	
S9	509	RR	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	541	
S7	218	NG	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	249	
S2	516	RG	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	547	
S6	574	NI	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	604	
S8	1297	KG	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	1327	
S1	523	NQ	II	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	SS	555	
S5	1152	SG	IV	VV	HH	DD	II	KK	PS	NN	VV	LL	DD	MM	SS	1183	

OBR. 7u

OBR. 7t

S7	250	563
S2	540	260
S6	605	570
S8	1320	625
S1	556	1346
S5	1184	576
		1216

40/46

S3	295	324
S4	295	324
S9	564	593
S7	269	290
S2	571	600
S6	626	655
S8	1347	1377
S4	514	606
S5	1247	1249

ORR 7v

OBR. 7w

OBR. 7x

OBR. 7y

OBR. 72

OBR. 7aa

OBR. 7bb

88