

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**299 682**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006 01)  
C12N 15/54 (2006 01)  
C12N 9/12 (2006 01)  
C12N 1/19 (2006 01)  
C12N 15/81 (2006 01)  
C12N 1/21 (2006 01)  
C12N 5/10 (2006 01)  
C12N 15/85 (2006 01)  
C12N 15/86 (2006 01)  
C12N 15/11 (2006 01)  
C12N 9/00 (2006 01)  
C07K 14/47 (2006 01)  
C07K 16/18 (2006 01)  
C07K 16/40 (2006 01)  
A61K 48/00 (2006 01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLového  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998-3183**  
(22) Přihlášeno: **01.04.1997**  
(30) Právo přednosti: **02.04.1996 IL 1996/117800**  
**26.08.1996 IL 1996/119133**  
(40) Zveřejněno: **12.05.1999**  
**(Věstník č. 5/1999)**  
(47) Uděleno: **09.09.2008**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **15.10.2008**  
**(Věstník č. 42/2008)**  
(86) PCT číslo: **PCT/IL1997/000117**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/037016**

(56) Relevantní dokumenty:

Rothe, M. et al.: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. Cell 83,1243-1252, 1995; Mosialos, G. et al.: The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. Cell 80,389-399, 1995.

(73) Majitel patentu:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.,  
Rehovot, IL

(72) Puvodce:

Wallach David, Rehovot, IL  
Malinin Nikolai, Rehovot, IL  
Boldin Mark, Rehovot, IL  
Kovalenko Andrei, Rehovot, IL  
Mett Igor, Rehovot, IL

(74) Zástupce:

KOREJZOVÁ & SPOL., v.o.s., JUDr. Zdeňka  
Korejzová, advokátka, Korunní 104/E, Praha 10, 10100

(54) Název vynálezu:

**Izolovaný polypeptid, který se váže na faktor 2,  
asociovaný s receptorem TNF (TRAF2)**

(57) Anotace:

Izolovaný polypeptid, který se váže na faktor 2, asociovaný s receptorem TNF (TRAF2) a moduluje aktivitu nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), přičemž polypeptid je tvořen a) sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:3, sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:6, nebo sekvencí aminokyselin SEQ ID No:7, b) sekvencí aminokyselin, která je fragmentem a) který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B, c) sekvencí aminokyselin, která je analogem a) nebo b), obsahuje méně než deset změn v sekvenci aminokyselin a) nebo b) a která se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B, d) derivátem a), b) nebo c), který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B. Použití polypeptidu např. ve farmaceutických kompozicích.

**CZ 299682 B6**

## Izolovaný polypeptid, který se váže na faktor 2, asociovaný s receptorem TNF (TRAF2)

### Oblast techniky

Vynález se týká izolovaného polypeptidu, který se váže na faktor 2 asociovaný s receptorem TNF, izolované sekvence DNA, kódující tento polypeptid, vektoru s obsahem této sekvence, způsobu izolace tohoto polypeptidu a jeho použití pro výrobu farmaceutických prostředků pro léčení stavů, asociovaných s indukcí  $\text{FN-}\kappa\text{B}$ .

### Dosavadní stav techniky

Receptorová super-rodina faktoru nekrózy nádoru/nervového růstového faktoru (TNF/NGF) se definuje strukturální homologií mezi extracelulárními oblastmi svých členů (Bazan, J. F. (1993), *Current Biology* 3, 603–606; Beutler and van Hufel, C (1994), *Science* 264, 667–8. Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994), *Cell* 76, 959–962). Různé členy této receptorové rodiny, mimo dvou receptorů p55 TNF a Fas/APO1, nevykazují ve svých intracelulárních oblastech jasnou strukturální podobnost. Mezi receptory však existuje velká podobnost, což naznačuje, že sdílejí běžnou signální cestu. Jedním příkladem této podobnosti je schopnost několika receptorů rodiny TNF/NGF aktivovat transkripční faktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Tento běžný rys se připisuje schopnosti cytoplazmatického proteinu s názvem faktor 2 asociovaný s receptorem TNF (TRAF2), který aktivuje  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , aby se vázal na strukturálně nepodobné intracelulární domény několika receptorů rodiny TNF/NGF. Není známo na základě jakých mechanismů TRAF2 působí a jaká je odezva na různé receptory, na které se váže.

TRAF2 je člen nedávno popsané rodiny proteinů nazvané TRAF, která zahrnuje několik proteinů identifikovaných jako např. TRAF1, TRAF2 (Rothe, M., Wong S. C., Henzel, W. J. and Goeddel, D (1994) *Cell* 78: 681–692; publikovaná přihláška PCT WO 95/33051), TRAF3 (Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Y.-s., Hong, D. L., Lederman, S. and Baltimore, D. (1995) *Science* 267: 1494–1498 (1995)) a TRAF6 (Cao, Z., et al., (1996a) *Nature* 383, 443–446)). Všechny proteiny, které patří do rodiny TRAF, sdílejí vysoký stupeň identity aminokyselin na svém C-konci, zatímco N-terminální domény nemusí být příbuzné. Jak zobrazují schematické ilustrace TRAF2 (obr. č. 1), molekula na svém C-konci obsahuje motiv „ring finger“ a dva motivy „zinc finger“ podobného TFIIIA. C-terminální polovina molekuly zahrnuje oblast známou jako „doména TRAF“ obsahující potenciální oblast leucinového „zipru“, který se nachází mezi aminokyselinami 264 až 358 (nazývá se N-TRAF) a v jiné části, směrem ke karboxylovému konci domény, mezi aminokyselinami 359 až 501 (nazývané C-TRAF), který odpovídá za vázání TRAF na receptory a na jiné molekuly TRAF za vzniku homodimerů nebo heterodimerů.

Aktivace transkripčního faktoru  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  je manifestace signální kaskády iniciované stejnými receptory TNF/NGF a zprostředkované TRAF2.  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  obsahuje členy rodiny proteinů, které tvoří dimery s homologií s onkogenem Rel, které ve své dimerní formě působí jako transkripční faktory. Tyto faktory jsou všudypřítomné a podílejí se na regulaci exprese více genů. Ačkoliv se  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  zpočátku identifikoval jako faktor, který je konstitučně přítomný v B buňkách ve stadiu exprese lehkého řetězce Igk, je o něm primárně známo, že působí jako indukovatelný transkripční aktivátor. Ve většině známých případů se  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  chová jako primární faktor, přičemž indukce jeho aktivity probíhá působením pre-existujících molekul, které jsou přítomné v buňce ve své neaktivní formě. De-novo syntéza naopak uvolňuje indukovatelné transkripční faktory, které aktivují gen  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Účinky  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  jsou vysoce pleiotropické. Většina těchto účinků sdílí běžné rysy, jako je jejich rychlá indukce extracelulárními stimuly. Většina činidel a aktivujících  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  indukuje imunitní odezvu. Mezi uvedená činidla patří komponenty virů a bakterií, cytokiny, které regulují imunitní odezvu, UV záření a další. Řada těchto genů, které jsou regulovány  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  se podílí na imunitní odezvě (Blank, V., Kourilsky, P., and Israel, A (1992), *Trans Biochem.*

Sci 17, 135–40; Grilli, M., Chiu, J. J. and Lenardo, M. J. (1993). *Int Rev Cytol*; Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994) *Annu Rev Immunol* 13, 4357–66).

Jeden hlavní rys regulace NF- $\kappa$ B je, že tento faktor může existovat v cytoplazmatické vazebné formě (bez DNA), která se může indukovat ke translokaci do jádra, k vazbě na DNA a může aktivovat transkripci. Tato duální forma proteinů NF- $\kappa$ B se reguluje proteiny rodiny I- $\kappa$ B. Proteiny této rodiny obsahují domény repetice, jež se zpočátku stanovily v proteinu erytrocytů v ankyrinu (Gilmore, T. D., and Morin, P. J. (1993), *Trends Genet* 9, 427–33). V nestimulované formě se dimer NF- $\kappa$ B objevuje ve spojení s molekulou I- $\kappa$ B, která se s ním kontaktuje v cytoplazmě, a brání jeho interakci se sekvencí DNA vázající se na NF- $\kappa$ B a aktivaci transkripce. Disociace dimeru I- $\kappa$ B od NF- $\kappa$ B je kritickým krokem jeho aktivace pomocí řady indukujících činidel (DiDonato, J. A., Mercurio, F., and Karin, M. (1995), *Mol. Cell Biol.* 15, 1302–11). Mechanismy, které se podílejí na této regulaci, stále nejsou zcela jasné. Také není zcela objasněn způsob, jak je stanovena buněčná specifita ve vztahu k odpovědi na různá činidla indukující NF- $\kappa$ B.

Jedním z nejvíce potentních činidel indukujících NF- $\kappa$ B je cytokinový faktor nekrózy nádoru (TNF). Existují dva různé receptory, receptor p55 a p75. Jejich síla exprese v různých buňkách nezávisle kolísá (Vandeanbeelee, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fiers, W. (1995). *Trends Cell Biol.* 5, 392–400). Receptor p75 přednostně odpovídá za formu TNF vázanou na buňku (TNF se exprimuje v obou formách jako beta-transmembránový protein i jako rozpustný protein), zatímco receptor p55 účinně odpovídá za rozpustné molekuly TNF (Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Baxeiner, B., Georgopolous, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P., (1995). *Cell* 83, 793–802). Intracelulární domény dvou receptorů nejsou strukturně příbuzné a vážou se na různé cytoplazmatické proteiny. Alespoň část účinků TNF, které zahrnují cytocidální účinek TNF a indukci NF- $\kappa$ B, se může indukovat oběma receptory. Tento rys je buněčně specifický. Receptor p55 je schopný indukovat cytocidální účinek nebo aktivaci NF- $\kappa$ B ve všech buňkách, které vykazují takové účinky při odezvě na TNF. Receptor p75-R může mít takové účinky pouze v některých buňkách. Jiné buňky, ačkoli silně exprimují receptor p75-R, vykazují indukci účinků pouze při odezvě na stimulaci receptoru p55-R (Vandeanbeelee, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fries, W. (1995). *Trends Cell Biol.* 5, 392–400). Nezávisle na receptorech TNF, různé jiné receptory rodiny receptorů TNF/NGF, jako jsou CD30 (McDonald, P. P., Cassatella, M. A., Bald, A., Maggi, E., Romagnani, S., Gruss, H. J., and Pizzolo, G., (1995). *Eur. J. Immunol.* 25, 2870–6.), CD40 (Berberich, I., Shu, G. L., and Clark, E. A. (1994). *J. Immunol.* 153, 4357–66; Lalmanach-Girard, A. C., Chilles, T. C., Parker, D. C., and Rothstein, T. L. (1993). *J. Exp. Med.* 177, 1215–1219), beta-receptor lymfotoxinu a v několika málo typech buněk také Fas/APO1 (Rensing-Ehl, A., Hess, S., Ziegler-Heitbrock, H. W. L., Riethmüller, G., and Engelmann, H. (1995). *J. Immunol.* 154, 161–174), jsou schopny indukovat aktivaci NF- $\kappa$ B. Receptor IL-1 typ I také účinně spouští aktivaci NF- $\kappa$ B, sdílí většinu účinků receptorů TNF, ale nesdílí s nimi žádnou strukturní podobnost.

Aktivace NF- $\kappa$ B při spouštění různých těchto receptorů je výsledkem indukované fosforylace jeho asociovaných molekul I- $\kappa$ B. Tato fosforylace vede k degradaci I- $\kappa$ B, ke které s největší pravděpodobností dochází v proteasomu. Podstata kinázy, která fosforyluje I- $\kappa$ B, a mechanismus aktivace spouštění receptoru není stále ještě znám. V posledních dvou letech však vyšly najevo skutečnosti, jako například identita tří proteinů asociovaných s receptorem, které se pravděpodobně podílí na iniciaci fosforylace (uvedeno na diagramu na obr. č. 2a a č. 6). Zdá se, že protein, který se nazývá TRAF2 a který na počátku klonoval D. Goeddel a jeho kolegové (Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J. a Goeddel, D. V. (1994) *Cell* 78, 681–692), má důležitou úlohu při aktivaci NF- $\kappa$ B pomocí různých receptorů z rodiny TNF/NGF. Protein, který, když je silně exprimován, může samostatně způsobit aktivaci NF- $\kappa$ B, může se vázat na aktivovaný receptor p75 TNF-R (Rothe M., Wong, S. C., Henzel, W. J. a Goeddel, D. V. (1994) *Cell* 78, 681–692), na beta-receptor lymfotoxinu (Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E., (1995) *Cell* 80, 389–399), na CD40 (Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995a), *Science* 269, 1424–1427) a na CD-30 (data nejsou publikována)

a tím může zprostředkovat indukci NF- $\kappa$ B. TRAF2 se neváže na receptor p55 TNF ani na Fas/APO1, avšak může se vázat na protein asociovaný s receptorem p55, který se nazývá TRADD. TRADD má schopnost se vázat na protein asociovaný s Fas/APO1, jenž se nazývá MORT1 (nebo FADD, popisuje se v publikacích Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D., (1995b). *J. Biol. Chem.* 270, 7795–7798; a Boldin, M. P., et al., (1996) *Cell* 85, 803–815). Jiný protein, který vzájemně reaguje s receptorem, se nazývá RIP (Stanger, B. Z. et al., (1995) *Cell* 81, 513–523). Je také schopen vzájemně reagovat s TRAF2, stejně jako s FAS/APO1, TRADD, s receptorem p55 TNF a s MORT-1. Zatímco RIP je spojen s indukcí buněčné cytotoxicity (odumírání buněk), jeho schopnost vzájemně reagovat s TRAF2 také způsobuje aktivaci NF- $\kappa$ B. Může navíc také sloužit k zesílení interakce mezi FAS/APO1, MORT-1, p55 TNF receptorem a TRADD s TRAF2 při cestě, která vede k aktivaci NF- $\kappa$ B. Tyto asociace zjevně umožňují p55 TNF receptoru a Fas/APO1 spustit aktivaci NF- $\kappa$ B (Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995), *Cell* 81, 495–504; Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D., (1995b). *J. Biol. Chem.* 270, 7795–7798; Chinnalyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995) *Cell* 81, 505–512; Varfolomeev, E. E., Boldin, M. P., Goncharov, T. M., and Wallach, D. (1996), *J. Exp. Med.* In press). Spuštění aktivace NF- $\kappa$ B receptorem IL-1 se objevuje nezávisle na TRAF2 a může zahrnovat nedávno klonovanou proteinovou kinázu asociovanou s receptorem IL-1, která se nazývá IRAK (Croston, G. E., Cao, Z., and Goeddel, D. V., (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 16514–7).

Mechanismus působení TRAF2 není jasný. Identifikovalo se několik cytoplazmatických molekul, které se váží na TRAF2 (Rothe, M., Wong S. C., Henzel, W. J. and Goeddel, D. (1994) *Cell* 78: 681–692; Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayers, T. M., and Goeddel, D. V. (1995b), *Cell* 83, 1243–1252). Informace o těchto molekulách však neposkytují odpověď na otázku, jak TRAF2, který sám nevykazuje enzymatickou aktivitu, spouští fosforylaci I- $\kappa$ B. Informace o mechanismu, který určuje buněčně specifický patern aktivace TRAF2 pomocí různých receptorů tak, jak se pozoruje v případě indukce NF- $\kappa$ B pomocí dvou TNF receptorů, také neexistují.

Mimo to, co se uvádí shora v textu o různých TRAF proteinech, je nutné poznamenat, že TRAF2 se váže na receptory p55 (CD120a) a p75 (CD120b) TNF, stejně jako na několika dalších receptorů z rodiny TNF/NGF, buď přímo nebo nepřímo přes adaptorové proteiny. V této souvislosti se zmiňuje receptor FAS/APO1 a adaptorové proteiny MORT-1, TRADD a RIP. TRAF2 je nezbytný při aktivaci NF- $\kappa$ B (Wallach, D. (1996) *Eur. Cytokine Net.* 7, 713–724). TRAF3 však inhibuje aktivaci NF- $\kappa$ B prostřednictvím některých receptorů z rodiny TNF/NGF (Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995a), *Science* 269, 1424–1427), zatímco TRAF6 je nezbytný při indukci NF- $\kappa$ B prostřednictvím receptoru IL-1 (Cao, Z., et al., (1996a) *Nature* 383, 443–446)).

Co se týče aktivace NF- $\kappa$ B a jejího významu pro schopnost buňky přežít, nebyly dosud jasně vysvětleny různé intracelulární cesty, které se podílejí na uvedené aktivaci. Například problémem stále zůstává, zda se různé proteiny TRAF účastní aktivace přímo nebo nepřímo.

Co se týče různých členů receptorové rodiny TNF/NGF a jejich asociovaných intracelulárních signálních cest, které zahrnují různé adaptorové, mediátorové/modulátorové proteiny (uvedeno v izraelské patentové přihlášce č. 114615, 114986, 115319, 116588), ligandy TNF a FAS/APO1, mohou mít na buňku oba účinky, jak přinášející benefit, tak i destrukční. TNF se například podílí na obraně organismu proti nádorům a infekčním činidlům, podílí se také na zhojení poranění a to prostřednictvím indukce usmrcení nádorových buněk a virem infikovaných buněk a posílením antibakteriálních aktivit granulocytů. V těchto případech je odumírání buněk vyvolané TNF žádoucí. Účinek TNF může být také škodlivý. Je známo, že TNF jsou hlavním patogenním činidlem při řadě onemocnění, jako je septický šok, anorexie, revmatické onemocnění, zánětlivé reakce a reakce implantát versus hostitel. V takových případech odumírání buněk vyvolané TNF není žádoucí. Také například ligand FAS/APO1 má pozitivní a negativní účinky. Uvedený ligand FAS/APO1 indukuje prostřednictvím svého receptoru odumírání autoreaktivních T buněk během

jejich maturace. To znamená odumírání T buněk, které rozeznávají vlastní antigeny během svého vývoje a tím předcházejí autoimunnímu onemocnění. Dále, různé maligní buňky a buňky infikované HIV nesou na svém povrchu receptor FAS/APO1 a mohou se tak zničit aktivací uvedeného receptoru prostřednictvím jeho ligandu nebo k němu specifických protilátek, čímž tento receptor zprostředkuje aktivaci odumírání buněk (apoptózu) intracelulární cestou. Receptor FAS/APO1 může zprostředkovat škodlivé účinky. Jde například o neřízené odumírání tkáně, které se pozoruje u jistých onemocnění, jako je akutní hepatitida, která je doprovázena poškozením buněk jater.

Z toho, co bylo uvedeno shora v textu, vyplývá, že jmenovitě receptory rodiny TNF/NGF mohou na jedné straně indukovat cestu odumírání buněk a na druhé straně indukují cestu přežití buněk (prostřednictvím indukce NF- $\kappa$ B). Zjevně existuje intracelulární rovnováha mezi těmito dvěma opačnými cestami. Je-li nutné například dosáhnout maximálního poškození buněk zhoubného bujení nebo jiných infikovaných nebo nemocných buněk, je nutné mít ligand TNF  $\alpha$  nebo FAS/APO1, který indukuje pouze cestu odumírání buněk, aniž se indukuje NF- $\kappa$ B. Naopak, jestliže je nutná ochrana buněk, jako například při zánětu nebo při reakci implantát versus hostitel, při akutní hepatitidě, musí se zablokovat indukce odumírání buněk způsobené ligandem TNF  $\alpha$  nebo FAS/APO1 a zesílit indukce NF- $\kappa$ B. Navíc při jistých patologických okolnostech je nutné zablokovat intracelulární signální cestu zprostředkovanou receptorem p75 TNF a receptorem IL-1, zatímco v jiných případech je nutné zesílit tyto uvedené intracelulární cesty.

#### Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří izolovaný polypeptid, který se váže na faktor 2, asociovaný s receptorem TNF (TRAF2) a moduluje aktivitu nukleárního faktoru  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), polypeptid je tvořen a) sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:3, sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:6, nebo sekvencí aminokyselin SEQ ID No:7, b) sekvencí aminokyselin, která je fragmentem a) který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B, c) sekvencí aminokyselin, která je analogem a) nebo b), obsahuje méně než deset změn v sekvenci aminokyselin a) nebo b) a která se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B, d) derivátem a), b) nebo c), který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B.

Nové proteiny podle vynálezu jsou proto přímými modulátory/mediátory intracelulární biologické aktivity TRAF proteinů (např. indukce aktivace NF  $\kappa$ B prostřednictvím TRAF2 a TRAF6 a inhibice aktivace NF- $\kappa$ B prostřednictvím TRAF3).

Nové proteiny podle vynálezu jsou nepřímými modulátory/mediátory intracelulární biologické aktivity řady různých jiných proteinů, které jsou schopny přímo nebo nepřímo vzájemně reagovat s proteiny TRAF (např. receptor FAS/APO1, p55 TNF, p75 TNF, IL-1 a jejich asociovanými proteiny, jako je například MORT-1, TRADD, RIP).

Dále vynález popisuje antagonisty (např. protilátky, peptidy, organické sloučeniny nebo dokonce některé izoformy) nových proteinů, které se váží na TRAF. Zahrnuje jejich izoformy, analogy, fragmenty a deriváty, které se mohou použít při inhibici signálních procesů nebo specifitěji při inhibici aktivace NF- $\kappa$ B a s tím spojených procesech přežití buněk. Jestliže proteiny podle vynálezu vázající se na TRAF nebo protein TRAF, na který se váží (např. TRAF3), jsou samy inhibitory aktivace NF- $\kappa$ B, pak vynález zahrnuje antagonisty těchto proteinů, které se váží na TRAF, za účelem aktivace signálního procesu nebo specifitěji zablokování inhibice aktivace NF- $\kappa$ B a tak zesílení aktivace NF- $\kappa$ B, je-li to nutné.

Dále vynález popisuje použití nových proteinů vázajících se na TRAF, jejich izoform, analogů, fragmentů a derivátů za účelem izolace a charakterizace dalších proteinů nebo faktorů, které se mohou podílet na regulaci aktivity proteinů TRAF a/nebo receptorové aktivity, jak se uvádí shora v textu. Jde například o proteiny, které se mohou vázat na proteiny TRAF a mohou ovlivnit jejich aktivitu. Dále se mohou použít za účelem izolace nebo identifikace jiných receptorů nebo jiných

celulárních proteinů dále upstream nebo downstream v signálním procesu (procesech), na které se uvedené nové proteiny, analogy, fragmenty a deriváty váží, a proto se také podílejí na jejich funkci.

5 Dále vynález popisuje inhibitory, které se mohou zavést do buněk za účelem vazby nebo interakce s novými proteiny vázající TRAF a s jejich možnými izoformami. Tyto inhibitory mohou způsobit inhibici aktivity asociované s proteiny TRAF například při aktivaci NF- $\kappa$ B a tak, je-li to nutné, mohou inhibovat aktivaci NF- $\kappa$ B; nebo mohou způsobit inhibici inhibiční TRAF-asociované aktivity (např. TRAF3) při aktivaci NF- $\kappa$ B a tím, je-li to nutné posílit aktivaci NF- $\kappa$ B.

10 Vynález dále popisuje použití shora v textu uvedených nových TRAF vázajících proteinů, jejich izoform a analogů a derivátů jako antigenů při přípravě jejich polyklonálních a monoklonálních protilátek. Naopak, protilátky se mohou použít při čištění nových proteinů z různých zdrojů, jako jsou například buněčné extrakty nebo transformované buněčné linie.

15 Dále se protilátky mohou použít pro diagnostické účely, např. při identifikaci poruch spojených s abnormální funkcí buněčných účinků zprostředkovaných přímo proteiny TRAF nebo zprostředkovanými receptorem p55 TNF, receptorem FAS/APO1 nebo jinými příbuznými receptory a jejich asociovanými buněčnými proteiny (např. MORT-1, TRADD, RIP), které působí přímo nebo nepřímo, za účelem modulace/zprostředkování intracelulárních procesů prostřednictvím interakce s proteiny TRAF.

20 Dále vynález popisuje farmaceutické kompozice, které obsahují shora uvedené nové proteiny TRAF, jejich izoformy nebo analogy, fragmenty nebo deriváty, stejně jako farmaceutické kompozice, které zahrnují shora uvedené protilátky nebo jiné antagonisty.

V souladu s vynálezem se izolovala řada nových proteinů vázajících se na TRAF, zvláště proteiny vázající se na TRAF2. Tyto proteiny vázající se na TRAF2 vykazují vysokou specifitu vazby na TRAF2 (uvedeno v příkladech dále v textu) a proto jsou modulatory a mediatory intracelulární aktivity TRAF2. TRAF2 se podílí na modulaci a zprostředkování nejméně jedné intracelulární signální cesty, která se vztahuje k cestě přežití nebo životaschopnosti buňky, při které se přímo podílí TRAF2 na aktivaci NF- $\kappa$ B, který má ústřední úlohu pro přežití buňky. Ve skutečnosti jeden z těchto nových proteinů nazývaný NIK („kináza indukující NF- $\kappa$ B“) se váže na TRAF2 a stimuluje aktivitu NF- $\kappa$ B. Protein NIK je kináza sdílející sekvenční podobnost s několika MAPKK kinázami (uvedeno dále v textu). Dále TRAF2 tím, že je schopen přímé nebo nepřímé interakce se shora uvedeným receptorem p55 TNF, p75 TNF, receptory FAS/APO1 a s jejich asociovanými proteiny MORT-1, TRADD a RIP, je také mediátorem nebo modulatorem indukce NF- $\kappa$ B nebo aktivace aktivity, která náleží uvedeným receptorům. TRAF2 je proto modulator/mediátor buněčné cesty schopnosti přežití (což je opak buněčné cesty odumírání) zprostředkované těmito receptory a jejich asociovanými proteiny, přičemž rozsah interakce mezi uvedenými receptory a/nebo proteiny s TRAF2 je důležitý faktor aktivity těchto receptorů (když jsou aktivovány jejich ligandy) jmenovitě jestli buňky přežijí nebo odumřou. Proteiny podle vynálezu např. protein NIK má klíčovou úlohu při této interakci mezi TRAF2 a jinými proteiny/receptory, s kterými TRAF2 vzájemně reaguje, což jsou proteiny jako NIK, které specifickou vazbou na TRAF2 budou modulovat jeho aktivitu a/nebo budou mít svou aktivitu modulovanou interakcí s TRAF2.

50 Proteiny vázající se na TRAF, jako jsou např. proteiny vázající se na TRAF2 zahrnující NIK, se izolovaly a klonovaly za použití dvouhybridního systému, částečně nebo plně sekvenovaného a charakterizovaného a jak je v detailech popsáno dále v textu, jeví se být vysoce specifickými proteiny vázajícími se na TRAF2 a proto jsou specifickými modulatory/mediatory TRAF2.

55 Termín aktivita proteinu TRAF, např. aktivita TRAF2, znamená aktivitu při modulaci/mediaci při cestě přežití buněk, zvláště při indukci/aktivaci NF- $\kappa$ B. Termín aktivita proteinu vázajícího se na TRAF, zvláště proteinu vázajícího se na TRAF2, znamená modulaci/mediaci aktivity TRAF,

zvláště aktivity TRAF2 účinkem jejich specifického navázání na TRAF, zvláště na proteiny TRAF2. Tato modulace/mediace zahrnuje modulaci/mediaci přežití buněk, zvláště těch, které se vztahují k aktivaci/indukci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , na které se proteiny TRAF, zvláště TRAF2, přímo nebo nepřímo podílejí a tak se TRAF nebo TRAF2-vázající proteiny mohou považovat za nepřímé  
 5 modulátory/mediátory všech shora uvedených proteinů a pravděpodobně řady jiných, které se podílejí na přežití buňky, zvláště na aktivaci/indukci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , a na které se váže protein TRAF2 (nebo jiné proteiny TRAF) nebo se kterými TRAF2 (nebo jiné proteiny TRAF) vzájemně reaguje přímým nebo nepřímým způsobem.

10 Vynález dále popisuje sekvenci DNA kódující protein schopný se vázat na molekulu asociovanou s receptorem faktoru nekrózy nádoru.

Jedno provedení vynálezu popisuje sekvenci DNA kódující protein schopný vázat se na TRAF2.

15 Jiné provedení vynálezu je sekvence DNA kódující protein schopný se vázat nejméně na aminokyselinové zbytky 222 až 501 aminokyselinové sekvence TRAF2.

Jiné provedení sekvence DNA podle vynálezu zahrnuje:

20 (a) sekvenci cDNA zde designovaného klonu 9, který obsahuje nukleotidovou sekvenci znázorněnou na obr. č. 3a;

(b) sekvenci cDNA zde designovaného klonu 10, který obsahuje nukleotidovou sekvenci znázorněnou na obr. č. 4;

25 (c) sekvenci cDNA zde designovaného klonu 15, který obsahuje nukleotidovou sekvenci znázorněnou na obr. č. 5a;

(d) fragment sekvence (a) až (c), který kóduje biologicky aktivní protein schopný vázat se na  
 30 nejméně 222 až 501 aminokyselinovou sekvenci TRAF2;

(e) sekvenci DNA schopnou hybridizovat se sekvencí (a) až (d) za modulačně striktních podmínek, přičemž uvedená sekvence kóduje biologicky aktivní protein schopný vázat se na  
 35 nejméně 222 až 501 aminokyselinovou sekvenci TRAF2; a

(f) sekvenci DNA, která se degeneruje jako výsledek genetického kódu sekvence DNA definované v odstavcích (a) až (e) a která kóduje biologicky aktivní protein, který je schopný se vázat na nejméně 222 až 501 aminokyselinovou sekvenci TRAF2.

40 Ještě v dalším provedení vynálezu sekvence DNA podle vynálezu uvedené shora v textu zahrnuje:

Sekvenci DNA vybranou ze skupiny sekvencí, které jsou obsaženy ve zde designovaných klonech cDNA 9 a 15;

45 Sekvenci DNA, která kóduje protein, který také může modulovat aktivitu  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ; a

Sekvenci DNA vybranou ze skupiny sekvencí, které jsou obsaženy ve zde designovaném klonu cDNA 10.

50 Dalším preferovaným provedením vynálezu shora uvedených sekvencí DNA podle vynálezu je sekvence DNA obsahující sekvenci DNA, která kóduje protein NIK („kinázu indukující  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ).

Provedení shora uvedené sekvence DNA podle vynálezu kódující protein NIK zahrnuje:

- (i) sekvenci DNA kódující protein NIK, jeho izoformy, fragmenty nebo analogy, uvedený NIK, jeho fragmenty nebo analogy jsou schopny se vázat na protein TRAF2 a jsou schopny modulovat aktivitu NF- $\kappa$ B;
- (ii) sekvenci DNA, jako v odstavci (i) vybranou ze skupiny obsahující:
  - (a) sekvenci cDNA získanou z kódující oblasti nativního proteinu NIK;
  - (b) sekvence DNA schopné hybridizovat se sekvencí uvedenou v odstavci (a) za mírně omezených podmínek a kódovat biologicky aktivní protein NIK; a
  - (c) sekvence DNA, které se degenerují jako výsledek genetického kódu sekvencí definovaných v odstavcích (a) a (b) a které kódují biologicky aktivní protein NIK;
- (iii) sekvence DNA jako v odstavci (i) nebo (ii) uvedené shora v textu obsahující nejméně část sekvence uvedené na obr. č. 6 a kódující nejméně jeden aktivní protein NIK, jeho izoformu, analog nebo fragment;
- (iv) sekvence DNA jako v odstavci (iii) uvedeném shora v textu kódující protein NIK, izoformu, analog nebo fragment, který má nejméně část aminokyselinové sekvence uvedené na obr. č. 6.

Dále vynález popisuje proteiny nebo polypeptidy kódované DNA kódující sekvence podle vynálezu uvedené shora v textu, izoformy, analogy, fragmenty a deriváty uvedených proteinů a polypeptidů, které jsou schopny se vázat na protein TRAF2, s výhodou na nejméně aminokyseliny 222 až 501 proteinu TRAF2. Provedení těchto proteinů/polypeptidů a jejich izoform, analogů, fragmentů a derivátů podle vynálezu zahrnuje:

- (a) protein kódovaný zde označeným klonem 10;
- (b) protein, jeho izoformy, fragmenty, analogy a deriváty, kterým je protein NIK, jeho izoformy, fragmenty, analogy a deriváty kódované shora uvedenými sekvencemi DNA, které kódují uvedený protein NIK, izoformy, analogy, fragmenty a deriváty; a
- (c) protein NIK, jeho izoformy, analogy, fragmenty a deriváty, který je kódován shora uvedenými sekvencemi DNA kódujícími uvedený protein NIK, izoformy, analogy, fragmenty a deriváty, kde uvedený protein, izoformy, fragmenty a deriváty mají nejméně část aminokyselinové sekvence uvedené na obr. č. 6.

Vynález dále popisuje vektor obsahující libovolnou ze shora uvedených sekvencí DNA podle vynálezu, která je schopna být exprimována v hostitelských buňkách vybraných ze skupiny zahrnující prokaryontní a eukaryontní hostitelské buňky; přičemž transformované prokaryontní a eukaryontní buňky obsahují uvedený vektor.

Vynález dále popisuje způsob produkce proteinu, izoformy, analogu, fragmentu nebo derivátu kódovaného libovolnou ze shora uvedených sekvencí DNA podle vynálezu, který zahrnuje kultivaci shora uvedených transformovaných hostitelských buněk za podmínek vhodných pro expresi uvedeného proteinu, izoform, analogů, fragmentů nebo derivátů, které ovlivňují posttranslační modifikaci, aby vznikl uvedený protein, izoforma, analog, fragmenty nebo deriváty a izolaci uvedeného exprimovaného proteinu, izoform, analogů, fragmentů nebo derivátů.

Vynález dále popisuje protilátky nebo jejich aktivní fragmenty nebo deriváty, které jsou specifické pro shora uvedené proteiny vázající se na TRAF, jejich analogy, izoformy, fragmenty nebo deriváty nebo které jsou specifické pro protein NIK, jeho izoformu, analog, fragment nebo derivát uvedený shora v textu.

5

Vynález dále popisuje následující testovací metody:

- (i) Způsob testování ligandu schopného vázat se na protein podle vynálezu, jak se popisuje shora v textu, zahrnující jeho izoformy, analogy, fragmenty nebo deriváty. Tento způsob zahrnuje kontakt matrice afinitní chromatografie, ke které je upevněn uvedený protein, jeho izoforma, analog, fragment nebo derivát, s buněčným extraktem, přičemž ligand se naváže na uvedenou matici. Způsob dále zahrnuje eluci, izolaci a analýzu uvedeného ligandu.
- (ii) Způsob testování sekvence DNA kódující ligand schopný vázat se na protein, izoformu, analog, fragment nebo derivát podle vynálezu, jak se popisuje shora v textu, který zahrnuje aplikaci kvasinkové dvou-hybridní procedury, ve které sekvence kódující uvedený protein, izoformu, analog, derivát nebo fragment je nesena jedním hybridním vektorem a sekvence z cDNA nebo z genomové knihovny DNA jsou neseny druhým hybridním vektorem. Dále postup zahrnuje transformaci kvasinkových hostitelských buněk uvedenými vektory, izolaci pozitivně transformovaných buněk a extrakci uvedeného druhého hybridního vektoru za účelem získání sekvence kódující uvedený ligand.

Podobně vynález popisuje způsob izolace a identifikace proteinů, izoform, analogů, fragmentů podle vynálezu uvedených shora v textu, které jsou schopny se vázat přímo na TRAF2. Uvedený způsob zahrnuje aplikaci kvasinkové dvouhybridní procedury, ve které sekvence kódující uvedený TRAF2 je nesena jedním hybridním vektorem a sekvence z cDNA nebo z genomové knihovny DNA je nesena druhým hybridním vektorem. Dále postup zahrnuje transformaci kvasinkových hostitelských buněk uvedenými vektory, izolaci pozitivně transformovaných buněk a extrakci uvedeného druhého hybridního vektoru za účelem získání sekvence kódující uvedený protein, který se váže na uvedený TRAF2.

Vynález dále popisuje způsob modulace nebo mediace aktivity NF- $\kappa$ B v buňkách nebo libovolnou jinou intracelulární signální aktivitu modulovanou nebo zprostředkovanou TRAF2 nebo jinými molekulami nebo jejich izoformou, analogem, fragmentem nebo derivátem podle vynálezu. Uvedená metoda zahrnuje léčbu uvedených buněk. Do uvedených buněk se zavede jeden nebo více uvedených proteinů, jeho izoform, analogů, fragmentů nebo derivátů ve formě vhodné pro jeho intracelulární indukci nebo se do uvedených buněk zavede sekvence DNA kódující uvedený jeden nebo více proteinů, jeho izoformy, analogy, fragmenty nebo deriváty ve formě vhodného vektoru nesoucího uvedenou sekvenci. Uvedený vektor je schopný provést inzerci uvedené sekvence do uvedených buněk takovým způsobem, že uvedená sekvence se exprimuje v uvedených buňkách.

Provedení vynálezu týkající se zmíněného způsobu modulace/mediace aktivity NF- $\kappa$ B v buňkách nebo libovolné jiné intracelulární signální aktivity modulované nebo zprostředkované TRAF2 nebo jinými molekulami zahrnuje:

- (i) Způsob, kde se do léčených buněk zavede sekvence DNA kódující uvedený protein, izoformu, fragment, analog nebo derivát ve formě vhodného vektoru, který nese sekvenci. Uvedený vektor je schopen způsobit inzerci uvedené sekvence do uvedených buněk způsobem, který umožňuje expresi uvedené sekvence v uvedených buňkách.

(ii) Způsob, kde uvedené léčené buňky se transfekují rekombinantním zvířecím virovým vektorem. Uvedený způsob zahrnuje:

5 (a) konstrukci rekombinantního zvířecího virového vektoru, který nese sekvenci kódující virový povrchový protein (ligand), který je schopen se vázat na specifický povrchový buněčný receptor na povrchu uvedených buněk za účelem léčby, a druhou sekvenci kódující protein vybraný z uvedeného proteinu, izoformem, analogů, fragmentů a derivátů podle vynálezu, který, když se exprimuje v uvedených buňkách, je schopen modulovat/zprostředkovat aktivitu NF- $\kappa$ B nebo libovolnou jinou intracelulární signální aktivitu  
10 modulovanou/zprostředkovanou TRAF2 nebo jinými uvedenými molekulami; a

(b) infekci uvedených buněk uvedeným vektorem zmiňovaným v odstavci (a).

15 Vynález dále popisuje způsob modulace TRAF2 modulovaného/zprostředkovaného účinku na buňky. Způsob zahrnuje aplikaci protilátek nebo jejich aktivních fragmentů nebo derivátů podle vynálezu na uvedené buňky. Uvedená aplikace na buňky se provádí vhodnou kompozicí, která obsahuje protilátky, jejich aktivní fragmenty nebo deriváty, kde v případě, že protein vázající se na TRAF2 nebo jeho části jsou na extracelulárním povrchu uvedených buněk, je kompozice  
20 připravená za účelem extracelulární aplikace a když uvedené proteiny vázající TRAF2 jsou intracelulární, pak uvedené kompozice je připravená za účelem intracelulární aplikace.

Jiné způsoby podle vynálezu pro modulaci/TRAF2 modulovaného/zprostředkovaného účinku na buňky zahrnují:

25 (i) Způsob aplikace oligonukleotidové sekvence na uvedené buňky. Oligonukleotidová sekvence kóduje antisense sekvenci alespoň části sekvence DNA kódující protein vázající se na TRAF2. Touto sekvencí je libovolná sekvence podle vynálezu, jež se uvádí shora v textu. Uvedená sekvence je schopna blokovat expresi proteinu vázajícího se na TRAF2.

30 (ii) Způsob jako v odstavci (i), kde oligonukleotidová sekvence se zavede do uvedených buněk prostřednictvím rekombinantního viru, jak se uvádí shora v textu, přičemž uvedená sekundární sekvence uvedeného viru kóduje uvedenou oligonukleotidovou sekvenci.

35 (iii) Způsob obsahující aplikaci ribozymového postupu, kde vektor kódující ribozymovou sekvenci a schopný reagovat se sekvencí buněčné mRNA kódující protein vázající se na TRAF2, izoformu, analog, fragment nebo derivát podle vynálezu, je zaveden do uvedených buněk ve formě, která umožňuje expresi uvedené ribozymové sekvence v uvedených buňkách. Vektor v případě, že uvedená ribozymová sekvence se exprimuje v uvedených buňkách, vzájemně reaguje se sekvencí buněčné mRNA a štěpí uvedenou sekvenci mRNA, což  
40 vede k inhibici exprese uvedeného proteinu vázajícího se na TRAF2 v uvedených buňkách.

Je nutné poznamenat, že ve všech shora uvedených způsobech podle vynálezu proteinem podle vynálezu může být zvláště NIK nebo přinejmenším jedna z jeho izoform, analogů, fragmentů a derivátů.

45 Shora uvedené metody nebo jejich provedení podle vynálezu zahrnují také způsob prevence nebo léčby patologických podmínek asociovaných s indukcí NF- $\kappa$ B nebo s libovolnou jinou aktivitou zprostředkovanou proteinem TRAF2 nebo jinými molekulami, se kterými se protein, izoforma, analog, fragment nebo derivát podle vynálezu váží. Uvedený způsob zahrnuje aplikaci pacientovi  
50 efektivního množství proteinu, izoformy, analogu, fragmentu nebo derivátu podle vynálezu nebo molekuly DNA je kódující nebo molekuly schopné porušit interakci uvedeného proteinu, izoformy, analogu, fragmentu nebo derivátu podle vynálezu s TRAF2 nebo s libovolnou jinou molekulou, na kterou se uvedený protein, izoforma, analog, fragment nebo derivát váže. Při tomto způsobu uvedeným proteinem podle vynálezu aplikovaným pacientovi může být specifický protein kódovaný klonem 10, NIK, izoforma, analog, derivát nebo fragment proteinu NIK nebo  
55

molekula DNA, která ho kóduje. Protein kódovaný klonem 10 působí inhibicí indukce NF- $\kappa$ B, stejně jako jiné fragmenty NIK, zatímco NIK indukuje aktivaci NF- $\kappa$ B.

5 Vynález dále popisuje farmaceutickou kompozici vhodnou pro modulaci TRAF2 modulovaného/zprostředkovaného účinku na buňky, která obsahuje jako aktivní činidlo nejméně jeden z proteinů podle vynálezu vázajícího se na TRAF2, jeho biologicky aktivní fragmenty, analogy, deriváty nebo jejich směsi.

Jiné farmaceutické kompozice nebo jejich provedení podle vynálezu zahrnují:

10

(i) Farmaceutickou kompozici určenou pro modulaci účinku na buňky modulovaného/zprostředkovaného proteinem TRAF2, která obsahuje jako aktivní látku rekombinantní zvířecí virový vektor kódující protein schopný vázat se na buněčný povrchový receptor a kódující nejméně jeden protein vázající se na TRAF2, izoformu, aktivní fragmenty nebo analogy podle vynálezu.

15

(ii) Farmaceutickou kompozici vhodnou pro modulaci účinku na buňky modulovaného/zprostředkovaného proteinem TRAF2, která obsahuje jako aktivní látku oligonukleotidovou sekvenci kódující anti-sense sekvenci sekvence mRNA proteinu vázajícího se na TRAF2 podle vynálezu.

20

Další provedení shora uvedené farmaceutické kompozice je zvláště farmaceutická kompozice vhodná pro prevenci nebo léčbu patologických podmínek asociovaných s indukcí NF- $\kappa$ B nebo s libovolnou jinou aktivitou zprostředkovanou TRAF2 nebo jinými molekulami, na které se váže protein, analog, izoforma, fragment nebo derivát podle vynálezu. Uvedená kompozice obsahuje účinné množství proteinu, analogu, izoformy, fragmentu nebo derivátu podle vynálezu nebo molekulu DNA je kódující nebo molekulu schopnou poškodit interakci uvedeného proteinu, izoformy, analogu, fragmentu nebo derivátu podle vynálezu s TRAF2 nebo libovolné jiné molekuly, na kterou se uvedený protein, izoforma, analog, fragment nebo derivát váže. V ještě dalším specifickém provedení vynálezu uvedená farmaceutická kompozice obsahuje účinné množství proteinu kódovaného klonem 10, proteinu NIK, izoformy, analogu, derivátu nebo fragmentu proteinu NIK nebo molekuly DNA je kódující.

25

30

V jiném specifickém provedení vynálezu se popisuje farmaceutická kompozice vhodná pro prevenci nebo léčbu patologických podmínek asociovaných s indukcí NF- $\kappa$ B nebo s libovolnou jinou aktivitou zprostředkovanou proteinem TRAF2 nebo jinými molekulami, na které se protein NIK váže. Uvedená kompozice obsahuje molekulu schopnou interferovat s kinázovou aktivitou proteinu NIK. V této kompozici interferující molekula může být účinné množství proteinu NIK, který je mutován v aktivním místech zbytků, tento mutovaný protein NIK slouží k interferenci s přirozeným proteinem NIK zvláště s kinázovou aktivitou proteinu NIK.

40

Jedním známým onemocněním spojeným s (abnormální) indukcí NF- $\kappa$ B je AIDS, dalším onemocněním je např. autoimunitní onemocnění, stejně jako nádory.

45 Dalšími provedeními vynálezu jsou:

(i) Způsob identifikace a produkce ligandu schopného modulovat buněčnou aktivitu modulovanou/zprostředkovanou proteinem TRAF2. Tento způsob zahrnuje:

50

(a) testování ligandu schopného vázat se na polypeptid obsahující nejméně část TRAF2, který má aminokyselinové zbytky 221 až 501 proteinu TRAF2;

55

(b) identifikace a charakterizace ligandu jiného než TRAF2 nebo částí receptoru receptorové rodiny TNF/NGF, který se zjistil v uvedeném testovacím kroku a který je schopen se vázat uvedeným způsobem; a

- (c) produkce uvedeného ligandu v podstatě izolované a čištěné formě.
- (ii) Způsob identifikace a produkce ligandu schopného modulovat buněčnou aktivitu modulovanou/zprostředkovanou proteinem, izoformou, analogem, fragmentem nebo derivátem podle vynálezu. Tento způsob zahrnuje:
- (a) testování ligandu schopného vázat se na polypeptid obsahující nejméně část sekvence proteinu NIK uvedené na obr. č. 6;
- (b) identifikaci a charakterizaci ligandu jiného než je TRAF2 nebo částí receptoru receptorové rodiny TNF/NGF, který se našel v uvedeném testovacím kroku a který je schopen se vázat uvedeným způsobem; a
- (c) produkce uvedeného ligandu v podstatně izolované a čištěné formě.
- (iii) Způsob identifikace a produkce ligandu schopného modulovat buněčnou aktivitu modulovanou/zprostředkovanou proteinem NIK, který zahrnuje:
- (a) testování ligandu schopného vázat se na polypeptid obsahující nejméně část sekvence proteinu NIK uvedené na obr. č. 6;
- (b) identifikaci a charakterizaci ligandu jiného než je TRAF2 nebo částí receptorů receptorové rodiny TNF/NGF, který se zjistil v uvedeném testovacím kroku a který je schopen se vázat uvedeným způsobem; a
- (c) produkce uvedeného ligandu v podstatně izolované a čištěné formě.
- (iv) Způsob produkce a identifikace ligandu schopného přímo nebo nepřímo modulovat buněčnou aktivitu modulovanou/zprostředkovanou proteinem NIK. Tento způsob zahrnuje:
- (a) testování molekuly schopné modulovat aktivity modulované/zprostředkované proteinem NIK;
- (b) identifikaci a charakterizaci uvedené molekuly; a
- (c) produkci uvedené molekuly v podstatně izolované a čištěné formě.
- (v) Způsob produkce a identifikace ligandu schopného přímo nebo nepřímo modulovat buněčnou aktivitu modulovanou/zprostředkovanou proteinem, izoformou, analogem, fragmentem nebo derivátem podle vynálezu.
- Způsob zahrnuje:
- (a) testování molekuly schopné modulovat aktivity modulované/zprostředkované proteinem, izoformou, analogem, fragmentem nebo derivátem podle vynálezu;
- (b) identifikaci a charakterizaci uvedené molekuly; a
- (c) produkci uvedené molekuly ve v podstatě izolované a čištěné formě.

Vynález se týká sekvencí DNA kódující proteiny schopné vázat se na molekulu faktoru (TRAF) asociovaného s receptorem faktoru nekrózy nádoru a proteiny, které uvedená sekvence DNA kóduje.

V preferovaném provedení vynálezu jsou sekvence cDNA označené jako klon 9, klon 10 a klon 15 (jsou znázorněny na obr. č. 3a, 4, a 5a), které klonují proteiny schopné se vázat na TRAF2, a proteiny, které tyto sekvence kódují.

- 5     Další preferovaným provedením vynálezu je sekvence DNA kódující protein NIK a samotný protein NIK.

Shora uvedené DNA a dedukované aminokyselinové sekvence reprezentují nové sekvence; ty se nevyskytují v datových buňkách DNA nebo aminokyselinových sekvencích „GENEBANK“ a „PROTEIN BANK“.

10     Vynález také zahrnuje fragmenty shora uvedených sekvencí DNA a sekvence DNA schopné hybridizovat s těmito sekvencemi nebo s jejich částmi, za stringentních podmínek. Sekvence kódují biologicky aktivní protein nebo polypeptid schopný vázat se přinejmenším na aminokyselinovou sekvenci 222 až 501 TRAF2.

Vynález také zahrnuje sekvenci DNA, která se degeneruje jako výsledek genetického kódu shora uvedených sekvencí DNA a které kódují biologicky aktivní protein nebo polypeptid schopný vázat se na nejméně 222 až 501 aminokyselinovou sekvenci TRAF2.

20     S ohledem na TRAF2 je nutné poznamenat, že několik členů receptorové rodiny TNF/NGF aktivuje transkripční faktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  přímou nebo nepřímou asociací s TRAF2, který pak slouží jako adaptorový protein pro tyto receptory a tak se může považovat za modulátor/mediátor indukce aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  těchto receptorů TNF/NGF (uvedeno na schématu na obr. č. 2).  
 25     Jiný receptor, receptor IL-1, aktivuje  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  nezávisle na TRAF2. Jedno z provedení vynálezu preferuje protein NIK podle vynálezu, jako protein vázající se na TRAF2. TRAF2 se váže na protein NIK velmi specificky a stimuluje tak aktivitu  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Protein NIK je serin/treonin kináza, jejíž sekvence je podobná sekvenci několika MAPKK kináz (uvedeno v příkladech dále v textu).  
 30     Analogy nebo muteiny proteinu NIK, které vznikají v souladu s vynálezem (uvedeno v příkladech dále v textu) a které nevykazují kinázovou aktivitu proteinu NIK, nejsou úspěšné při stimulaci aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . V případě, že takové analogy/muteiny proteinu NIK se exprimují v buňkách, také blokují indukci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  pomocí TNF, stejně jako jinými indukčními činidly, jako je bakteriální endotoxin LPS, forbolmyristatacetat (aktivátor proteinové kinázy C) a HTLV-1 protein TAX. TNF indukce aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  se děje prostřednictvím libovolného ze dvou  
 35     receptorů TNF (receptory p55 a p75 TNF) a proto je zřejmé, že muteiny/analogy proteinu NIK blokují indukci aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  prostřednictvím receptorů. Ligand receptorů TNF a FAS/APO1 může také indukovat aktivitu  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  prostřednictvím příbuzného receptoru. Indukce receptoru FAS/APO1 se také blokuje muteiny/analogy proteiny NIK. Shora uvedené receptory mají adaptorové proteiny TRADD, RIP a MORT1, které mohou také všechny indukovat aktivitu  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , ale  
 40     jejichž indukce se také blokuje muteiny/analogy proteinu NIK. Navíc takové muteiny/analogy proteinu NIK také blokují indukci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  IL-1 (fungující přes receptor IL-1). Z toho vyplývá, že protein NIK se účastní na kaskádě indukce  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , která je běžná v případě receptorů z rodiny TNF/NGF a receptoru IL-1. Protein NIK se také jeví, že působí přímo při indukci aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  pravděpodobně přímým zesílením fosforylace  $\text{I-}\kappa\text{B}$ . Tento závěr vznikl na základě současného  
 45     pozorování, kdy shora uvedené muteiny/analogy proteinu NIK, jsou-li exprimovány v buňkách, nevykazují kinázovou aktivitu (také se nazývají dominantní negativní mutanty), čímž neovlivňují žádným způsobem aktivitu Jun kinázy indukovanou TNF, což indikuje, že protein NIK způsobuje specificky zvýšení fosforylace  $\text{I-}\kappa\text{B}$ , aniž ovlivňuje kinázu MAP, která se účastní fosforylace Jun.

50     Vynález zahrnuje sekvence DNA kódující biologicky aktivní proteiny vázající se na TRAF, např. proteiny vázající se na TRAF2, jako je například protein NIK, stejně jako jeho analogy, fragmenty a deriváty a analogy, fragmenty a deriváty proteinů, které tyto sekvence kódují. Příprava takových analogů, fragmentů a derivátů se provádí standardními postupy (např. podle publikace  
 55     Sambrook et al., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N. Y.), při kterých se v sekvencích DNA mohou deletovat, adovat nebo substituovat jeden nebo více kodonů za vzniku kódovaných analogů, které mají nejméně jednu změnu aminokyselinového zbytku ve srovnání s nativním proteinem. Přijatelnými analogy jsou ty, které si ponechávají přinejmenším schopnost vázat se na TRAF2, přičemž zprostředkovávají nebo nezprostředkovávají další vazbu nebo enzymatickou aktivitu, jsou to například analogy, které se váží na TRAF2, ale nezpůsobují žádný signál. To znamená, že se neváží na žádný další downstream protein nebo jiný faktor nebo nekatalyzují reakci závislou na signálu. Takovým způsobem se mohou produkovat analogy, které se nazývají analogy s dominantním negativním účinkem, jmenovitě analog, který se buď neváže na TRAF2 nebo následně nesignalizuje takové následné navázání, jak se uvádí shora v textu. Takové analogy se mohou použít například při inhibici receptorů CD40, p55 TNF a p75 TNF (FAS/APO1 a jiných příbuzných účinků receptorů, stejně jako účinků zprostředkovaných různými proteiny asociovanými s receptory (adapto-ry), jak se popisuje shora v textu, kompetici s přirozenými proteiny vázajícími se na TRAF2). Mohou se produkovat tak zvané dominantní pozitivní analogy, které slouží k zesílení účinku TRAF2. Tyto analogy mají stejné nebo lepší vlastnosti navázání se na TRAF2 a stejné nebo lepší signalizační vlastnosti přirozených proteinů vázajících se na TRAF2. Analogickým způsobem se mohou připravit biologicky aktivní fragmenty klonů podle vynálezu s ohledem na přípravu analogů. Vhodné fragmenty sekvencí DNA podle vynálezu jsou ty, které kódují protein nebo polypeptid, který si ponechává schopnost vázat se na TRAF2 nebo který může zprostředkovat libovolné jiné navázání nebo enzymatickou aktivitu, jak se popisuje shora v textu. Stejně tak se mohou připravit fragmenty kódovaných proteinů podle vynálezu, které mají dominantní negativní nebo dominantní pozitivní účinek, jak se popisuje shora v textu, ve srovnání s analogy. Podobně se mohou připravit standardními modifikacemi vedlejších skupin jednoho nebo více aminokyselinových zbytků proteinů deriváty, jejich analogy nebo fragmenty nebo konjugací proteinů, jejich analogů nebo fragmentů jinými molekulami, např. s protilátkami, enzymem, atd., které jsou dobře známy v oboru.

Co se týká sekvencí DNA podle vynálezu, které kódují protein vázající se na TRAF (např. protein vázající TRAF2), jako je např. protein NIK), izoformu, analog, fragment nebo derivát, ty jsou také předmětem vynálezu. Sekvence DNA schopné hybridizovat se sekvencemi cDNA odvozenými z kódující oblasti nativního proteinu vázajícího se na TRAF. Taková hybridizace se uskutečňuje za omezených podmínek. Uvedené hybridizovatelné sekvence DNA jsou schopny kódovat biologicky aktivní protein vázající se na TRAF. Uvedené sekvence proto zahrnují sekvence DNA, které mají relativně vysokou homologii se sekvencí cDNA nativních proteinů vázajících se na TRAF (např. sekvence cDNA proteinu vázajícího se na TRAF2, například cDNA proteinu NIK). Takovým reprezentantem sekvencí proteinu vázajícího se na TRAF může být např. přirozeně odvozená sekvence kódující různé izoformy proteinu vázajícího se na TRAF nebo přirozeně se vyskytující sekvence kódující proteiny patřící do skupiny sekvencí proteinů vázajících se na TRAF, které kódují protein s aktivitou proteinů vázajících se na TRAF (např. protein vázající se na TRAF2, jako je například protein NIK). Dále mohou také tyto sekvence zahrnovat například synteticky připravené sekvence, které se přirozeně nevyskytují a které jsou podobné sekvenci cDNA přirozeného proteinu vázajícího se na TRAF, ale zahrnují řadu požadovaných modifikací. Takové syntetické sekvence proto zahrnují všechny možné sekvence kódující analogy, fragmenty a deriváty proteinů vázajících se na TRAF (například proteiny vázající se na TRAF2, jako je například protein NIK), kdy každá z nich vykazuje aktivitu proteinů vázajících se na TRAF.

Za účelem získání shora uvedených přirozeně se vyskytujících sekvencí podobných proteinu vázajícímu se na TRAF se používají standardní postupy testování a izolace přirozeně získaných vzorků DNA a RNA z různých tkání, přičemž se může použít jako sonda přirozená cDNA proteinu vázajícího se na TRAF nebo její části (popis standardních postupů se uvádí ve shora uvedené publikaci Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.).

Za účelem přípravy, jak se popisuje shora v textu, různých syntetických sekvencí podobných proteinu vázajícímu se na TRAF, které kódují analogy, fragmenty nebo deriváty proteinů vázajících se na TRAF (například proteiny vázající se na TRAF2, jako je např. NIK) se může použít řada standardních postupů, které se zde popisují dále v textu v souvislosti s přípravou takových analogů, fragmentů a derivátů.

Polypeptid nebo protein, který „v podstatě odpovídá“ proteinu vázajícímu se na TRAF zahrnuje ne pouze protein vázající se na TRAF, ale také polypeptidy nebo proteiny, které jsou analogy proteinu vázajícího se na TRAF.

Analogy, které v podstatě korespondují s proteinem vázajícím se na TRAF, jsou ty polypeptidy, ve kterých jedna nebo více aminokyselin aminokyselinové sekvence proteinu vázajícího se na TRAF je nahrazena jinou aminokyselinou, je deletována a/nebo nese inzert, což vede ke vzniku proteinu, který vykazuje v podstatě stejnou nebo silnější biologickou aktivitu, jako protein vázající se na TRAF, kterému odpovídá.

Aby vzniklý protein v podstatě odpovídal proteinu vázajícímu se na TRAF, změny v sekvenci proteinu vázajícího se na TRAF jsou obecně relativně malé. Ačkoli počet změn může být větší jak deset, upřednostňuje se, aby změn nebylo více jak deset, s výhodou ne více jak pět a nejvýhodnější počet změn nepřesáhne číslo tři. Za účelem najít potenciálně biologicky aktivní proteiny, které v podstatě odpovídají proteinům vázajícím se na TRAF, se mohou použít libovolné metody. Jedna z těchto metod je metoda konvenční mutagenese DNA, která kóduje protein. Výsledkem je několik modifikací. U proteinů exprimovaných takovými klony se pak může testovat jejich schopnost vázat se na proteiny TRAF (například TRAF2) a modulovat tak aktivitu proteinu TRAF (například TRAF2) při modulaci/mediaci intracelulární cesty, která se popisuje shora v textu.

Termín „konzervativní“ změny znamená ty změny, které nezmění aktivitu proteinu a obvykle se testují jako první a jsou to změny, které podstatně nemění velikost, náboj nebo konfiguraci proteinu a také se neočekává, že by měnily jeho biologické vlastnosti.

Konzervativní substituce proteinů vázajících se na TRAF zahrnují analog, kde nejméně jeden aminokyselinový zbytek v polypeptidu je konzervativně nahrazen odlišnou aminokyselinou. Takové substituce se přednostně provádějí v souladu s následujícím seznamem uvedeným v tabulce č. 1A. Substituce se mohou stanovit rutinními experimenty za účelem odhalit modifikované strukturní a funkční vlastnosti syntetizované molekuly polypeptidu, zatímco si udržuje biologickou aktivitu charakteristickou pro protein vázající se na TRAF.

Tabulka 1A

| původní zbytek | příklad substituce |
|----------------|--------------------|
| Ala            | Gly; Ser           |
| Arg            | Lys                |
| Asn            | Gln; His           |
| Asp            | Glu                |
| Cys            | Ser                |
| Gln            | Asn                |
| Glu            | Asp                |
| Gly            | Ala; Pro           |
| His            | Asn; Gln           |
| Ile            | Leu; Val           |

|   |     |               |
|---|-----|---------------|
|   | Leu | Ile; Val      |
|   | Lys | Arg; Gln; Glu |
|   | Met | Leu; Tyr; Ile |
|   | Phe | Met; Leu; Tyr |
| 5 | Ser | Thr           |
|   | Thr | Ser           |
|   | Trp | Tyr           |
|   | Tyr | Trp; Phe      |
|   | Val | Ile; Leu      |

10

Alternativně jiná skupina substitucí proteinu vázajícího se na TRAF jsou ty, ve kterých se odstraní nejméně jeden aminokyselinový zbytek v polypeptidu a na jeho místo se zavedl jiný zbytek, podle následující tabulky č. IB. Typy substitucí, které mohou v polypeptidu proběhnout, mohou být založeny na analýze frekvence aminokyselinových změn mezi homologním proteinem různých specií, jako jsou ty přítomné v tabulce č. 1 až 2 uvedených v publikaci Schulz et al., G. E., Principles of Protein Structure Springer-Verlag, New York, NY, 1978 a na obrázcích 3 až 9 uvedených v publikaci Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA 1983. Na základě takové analýzy se definují alternativní konzervativní substituce jako změny jedné z následujících skupin:

20

#### Tabulka č. IB

1. malé alifatické, monopolární nebo slabě polární zbytky: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. polární negativně nabitě zbytky a jejich amidy: Asp, Asn, Glu Gln;
3. polární, pozitivně nabitě zbytky: His, Arg, Lys;
- 30 4. velké alifatické monopolární zbytky: Met, Leu, Ile, Val (Cys); a
5. velké aromatické zbytky: Phe, Tyr, Trp.

Tři aminokyselinové zbytky uvedené v závorkách mají speciální úlohu v architektuře proteinu. Gly je jediný zbytek, který se nenachází v bočním řetězci a tak řetězci propůjčuje flexibilitu. Tyto tendence však podporují tvorbu jiné sekundární struktury, než je  $\alpha$ -helix. Zbytek Pro, vzhledem k jeho neobvyklé geometrii, silně nutí řetězec vytvořit struktury podobné  $\beta$ -ohybu, ačkoli v některých případech Cys může být schopen se podílet na tvorbě disulfidových můstků, které jsou důležité při balení proteinů. Je nutné poznamenat, že v publikaci Schulz et al., G. E., Principles of Protein Structure Springer-Verlag, New York, NY, 1978 splývají skupina 1 a 2. Dále je nutno poznamenat, že Tyr vzhledem ke svému potenciálu tvořit vodíkové vazby vykazuje podstatnou příbuznost se Ser a Thr, atd.

Konzervativní aminokyselinové substituce podle vynálezu, jak jsou například uvedeny shora v textu, jsou dobře známy v oboru a očekává se, že po aminokyselinové substituci si polypeptid udrží biologické a strukturální vlastnosti. Většina delecí a substitucí podle vynálezu jsou ty, které radikálně nemění charakteristiky molekuly proteinu nebo polypeptidu. Termín „charakteristika“ se definuje neinkluзивním způsobem. Definuje obě změny v sekundární struktuře, například  $\alpha$ -helix nebo  $\beta$ -list, stejně jako změny biologické aktivity, například navázání se na proteiny TRAF a/nebo mediace účinku proteinů TRAF na odumírání buněk.

50

Příklady produkce aminokyselinových substitucí v proteinech, které se mohou použít při získání analogů proteinů vázajících se na TRAF podle vynálezu zahrnují libovolnou známou metodu, jak se uvádí v publikacích U.S. patent RE 33 653, US 4 959 314, US 4 588 585 a US 4 737 462 Mark et al.; US 5 116 943 Koths et al., US 4 965 195 Namen et al., US 4 879 111 Chong et al., a US 5 017 691 Lee et al.; a lyzinem substituované proteiny popisované v patentu US 4 904 584 (Shaw et al.).

Vedle konzervativních substitucí, které se diskutují shora v textu a které nepodstatně mění aktivitu proteinu vázajícího se na TRAF, existují buď konzervativní substituce nebo méně konzervativní substituce a náhodné změny, které vedou k zesílení biologické aktivity analogů proteinů vázajících se na TRAF, což je také předmětem vynálezu.

V případě, že se má potvrdit přesný účinek substituce nebo delece, odborník upřednostní, aby se účinek substituce(i), delece(i) atd. vyhodnotil testy rutinního navázání a odumření buněk. Testování za použití takových standardních testů nezahrnuje provádět experimenty.

Na úrovni genů se tyto analogy obecně připravují místně řízenou mutagenézou nukleotidů v DNA kódující protein vázající se na TRAF, přičemž vzniká DNA kódující analog a pak se syntetizuje DNA a v rekombinantní buněčné kultuře se exprimuje polypeptid. Analogy v typickém případě ve srovnání s přirozeně se vyskytujícím proteinem vykazují stejnou nebo kvalitativně lepší biologickou aktivitu (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987–1995, Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Příprava proteinu vázajícího se na TRAF nebo alternativní nukleotidové sekvence kódující stejný polypeptid, ale lišící se od přirozené sekvence, způsobuje změny umožněné známou degenerací genového kódu, se může provést místně specifickou mutagenézou DNA, která kóduje dříve připravený analog nebo nativní verzi proteinu vázajícího se na TRAF. Místně specifická mutagenese umožňuje produkci analogů použitím specifických oligonukleotidových sekvencí, které kódují sekvenci DNA požadované mutace, stejně jako dostatečné množství přilehlých nukleotidů, aby vznikla primární sekvence o dostatečné velikosti a sekvenční komplexnosti, přičemž vzniká duplex na obou stranách delečního spojení, které je překryté. V typickém případě se preferuje primer s přibližně 20 až 25 nukleotidy, přičemž na každé straně sekvence se pozměnilo 5 až 10 komplementárních nukleotidů. Metoda místně specifická mutagenese je dobře známa v oboru a popisuje se v publikaci Adelman et al., *DNA 2*: 183 (1983).

Je výhodné, když se při způsobu místně specifické mutagenese použije fágový vektor, který existuje v obou formách, jak jednořetězcové tak dvouřetězcové. Typické vektory, které se používají při místně řízené mutagenезi zahrnují vektory, jako fág M13, který se například popisuje v publikaci Messing et al., *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981). Tyto fágy jsou snadno dostupné a způsob jejich použití je v oboru obecně znám. V jiném případě se mohou použít vektory, které obsahují počátek replikace jednořetězcového fága (Veira et al., *Meth. Enzymol.* 153: 3, 1987) za vzniku jednořetězcové DNA.

Při místně řízené mutagenезi se nejdříve získá jednořetězcový vektor, který zahrnuje ve své sekvenci úsek DNA, který kóduje relevantní polypeptid. Oligonukleotidový primer nesoucí požadovanou mutovanou sekvenci se připravuje automatizovanou syntézou DNA/oligonukleotidu. Tento primer se pak spojí s jednořetězcovým vektorem, který obsahuje sekvenci proteinu. Aby se ukončila syntéza řetězce nesoucího mutaci, aplikují se enzymy polymerizující DNA, jako je například *E. coli* Klenow fragment polymerázy I. Pak mutovaná sekvence a druhý řetězec nese požadovanou mutaci. Tento heteroduplexní vektor se pak použije při transformaci vhodných buněk, jako jsou buňky *E. coli* JM101, selektují se klony, které zahrnují rekombinantní vektory nesoucí mutovanou sekvenci.

Poté, co se izoloval klon, může se odstranit sekvence proteinu vázajícího se na TRAF a umístit se do vhodného vektoru, obecně do transferovaného nebo expresivního vektoru typu, který se může použít při transfekci vhodného hostitele.

5 Gen nebo nukleová kyselina kódující protein vázající se na TRAF se může také detekovat, izolovat a/nebo modifikovat způsobem *in vitro*, *in situ* a/nebo *in vivo*, použitím známé metody amplifikace DNA nebo RNA, jako je PCR a chemická oligonukleotidová syntéza. PCR umožňuje amplifikaci (zvýšit počet) specifických DNA sekvencí opakovanými polymerázovými reakcemi DNA. Tato reakce se může použít jako náhrada klonování; vše co je pak potřeba je znalost  
10 sekvence nukleové kyseliny. Aby mohla proběhnout reakce PCR, vytvořily se primery, které jsou komplementární se sekvencí, o níž je zájem. Primery se pak vytvoří automatizovanou syntézou DNA. Vzhledem k tomu, že primery se mohou vytvořit tak, aby hybridizovaly s libovolnou částí genu, mohou se vytvořit podmínky, při kterých se tolerují chybná párování komplementárních bází. Amplifikace těchto chybně párovaných oblastí vede k syntéze mutovaných produktů za vzniku peptidu s novými vlastnostmi (to znamená místně řízená mutagenese) (Ausubel et al.,  
15 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987–1995). Spojením syntézy komplementární DNA (cDNA) za použití reverzní transkriptázy s PCR se může, jako počáteční materiál pro syntézu extracelulární domény receptoru prolaktinu, použít RNA, aniž se musí klonovat.

20 Navíc PCR primery se mohou vytvořit tak, aby zavedly na konec segmentu genu, která se má amplifikovat, nová restrikční místa nebo další rysy, jako jsou terminační kodony. Toto zanesení restrikčních míst na 5' a 3' konce amplifikované genové sekvence umožňuje využití genových segmentů kódujících protein vázající se na TRAF nebo aby se jeho fragment ligoval s jinými  
25 sekvencemi a/nebo s klonovacími místy ve vektorech.

PCR a jiné metody amplifikace RNA a/nebo DNA jsou dobře známy v oboru a mohou se použít podle vynálezu. Znamé metody amplifikace DNA nebo RNA zahrnují, ale nejsou omezeny na polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a příbuzné amplifikační metody (například patent  
30 US 4 683 195, US 4 683 202, US 4 800 159, US 4 965 188 Mullis et al.; US 4 795 699 a US 4 924 794 Tabor et al.; US 5 142 033 Innis et al.; US 5 122 464 Wilson et al.; US 5 091 310 Innis; US 5 066 584 Gyllensten et al.; US 4 889 818 Gelfand et al.; US 4 994 370 Silver et al., US 4 766 067 Biswas; US 4 656 134 Ringold a Innis et al., eds. PCR Protocols: A Guide to Method and Applications) a amplifikaci zprostředkovanou RNA, kde se při syntéze dvouřetěz-  
35 cové DNA jako templát cílové sekvence používá anti-sense RNA (patent US 5 130 238 Malek et al., NASBA). Imuno-PCR je metoda, která kombinuje použití amplifikace DNA se značením protilátkami (Ruzicka et al., Science 260: 487 (1993); Sano et al., Science 258: 120 (1992); Sano et al., Biotechniques 9: 1378 (1991)).

40 Analogickým způsobem s ohledem na analogy proteinů vázající se na TRAF se může připravit biologicky aktivní fragment proteinů vázajících se na TRAF (např. ty libovolné proteiny vázající se na TRAF2 (jako je například protein NIK nebo jeho izoformy). Vhodné fragmenty proteinů vázající se na TRAF jsou ty, které si uchovávají schopnosti proteinu vázajícího se na TRAF a které mohou zprostředkovat biologickou aktivitu proteinů TRAF nebo jiných proteinů přímo  
45 nebo nepřímo asociovaných s proteiny TRAF. Mohou se připravit fragmenty proteinů vázajících se na TRAF, které vykazují dominantně negativní nebo dominantně pozitivní účinek, jak se popisuje shora v textu s ohledem na analogy. Je nutné poznamenat, že tyto fragmenty reprezentují speciální třídu analogů podle vynálezu, jmenovitě se definují částí proteinů vázajících se na TRAF odvozených od celé sekvence proteinu vázajícího se na TRAF. Každá taková část nebo  
50 fragment mají libovolnou z požadovaných aktivit. Takovým fragmentem může být například peptid.

Podobně se mohou standardními modifikacemi vedlejších skupin jedné nebo více aminokyselinových zbytků proteinů vázajícího se na TRAF připravit deriváty, jeho analogy nebo fragmenty  
55 nebo konjugací proteinu vázajícího se na TRAF jeho analogy nebo fragmenty s jinou molekulou,

jako jsou například protilátky, enzym, receptor atd., které jsou dobře známy v oboru. Termín „deriváty“ znamená deriváty, které se mohou připravit z funkčních skupin, které se objevují jako vedlejší řetězce na zbytcích nebo na N-terminálních nebo C-terminálních skupinách způsobem dobře známým v oboru. Deriváty jsou také předmětem vynálezu. Deriváty mohou obsahovat chemické celky, jako jsou sacharidové a fosforečnanové zbytky. Uvedené frakce mají stejnou nebo vyšší biologickou aktivitu ve srovnání s proteiny vázajícími se na TRAF.

Deriváty mohou například zahrnovat alifatické estery karboxylových skupin, amidy karboxylových skupin, které vznikly reakcí s amoniakem nebo s primárními nebo sekundárními aminy, N-acylové deriváty nebo volné aminové skupiny aminokyselinových zbytků, které vzniknou s acylovými skupinami (např. alkanoylové nebo karbocyklické aroylové skupiny) nebo O-acylové deriváty volné hydroxylové skupiny (např. deriváty serylového nebo threonylového zbytku) vytvořené s acylovými celky.

Termín „deriváty“ také zahrnuje pouze ty deriváty, kde nedochází k záměně jedné aminokyseliny za libovolnou z dvaceti běžných přirozeně se vyskytujících aminokyselin.

Protein vázající se na TRAF je protein nebo polypeptid; to znamená sekvence aminokyselinových zbytků. Obsahem vynálezu je také polypeptid obsahující větší sekvenci, která zahrnuje celou sekvenci proteinu vázajícího se na TRAF, pokud neovlivňuje základní a nové charakteristiky vynálezu, to znamená jestliže uchovává nebo zvyšuje biologickou aktivitu proteinu vázajícího se na TRAF nebo se může štěpit, aby si protein nebo polypeptid ponechal biologickou aktivitu proteinu vázajícího se na TRAF. Tak například vynález zahrnuje fúzní proteiny proteinu vázajícího se na TRAF s jinými aminokyselinami nebo peptidy.

Jak se popisuje shora v textu rozumí se, že termín „proteiny vázající se na TRAF“ podle vynálezu jsou libovolné proteiny, které se mohou vázat a intracelulárně zprostředkovat/modulovat aktivitu libovolného proteinu TRAF. Určitými příklady jsou proteiny vázající se na TRAF, které mohou modulovat nebo zprostředkovat intracelulární signální aktivitu spojenou s TRAF, jak se uvádí shora v textu, zvláště se uvažuje podíl TRAF2 na indukci aktivity NF- $\kappa$ B, a následující interakce mezi TRAF2 a různými členy receptorové rodiny TNF/NGF a/nebo jejich asociovanými adaptorovými proteiny, jak se detailně popisuje shora a dále v textu. Specifický příklad takových proteinů vázajících se na TRAF2 je protein NIK a jeho různé analogy, fragmenty atd. (uvedeno v příkladech vynálezu), které se jeví, že váží TRAF2 velmi specificky a vykazují přímé působení při indukci aktivity NF- $\kappa$ B s různými dominantními negativními analogy/muteiny proteinů NIK blokujících tuto aktivitu.

Všechny tyto shora uvedené modifikace jsou obsahem vynálezu a udržují schopnost kódovaných proteinů nebo polypeptidů nebo jejich analogů a derivátů vázat nejméně aminokyselinovou sekvenci 222 až 501 TRAF2.

Všechny proteiny a polypeptidy podle vynálezu vzhledem ke svému účinku schopnosti vázat se na TRAF2 se považují za mediátory nebo modulátory signálů proteinu TRAF2. Jako takové uvedené molekuly podle vynálezu se účastní například signálních procesů, při kterých dochází k navázání ligandů TRAF2 na CD30, CD40,  $\beta$ -receptor lymfotoxinu (LT- $\beta$ ), p55 nebo p75 TNF receptory, stejně jako na jiné receptory a adaptorové proteiny uvedené shora v textu, což vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. Zvláště zajímavý je protein NIK a zvláště protein NIK kódovaný klonem 10 podle vynálezu: Detailní sekvenční analýza proteinu NIK a proteinu kódovaného klonem 10 (který se původně nazýval NMPI) dokládá kódované aminokyselinové sekvence odpovídající konzervativním motivům I až XI, které jsou charakteristické pro proteiny kinázy Ser/Thr, a určují funkci tohoto proteinu.

Nové klony proteinů, jejich analogy, fragmenty a deriváty nabízejí řadu využití:

(i) mohou se použít při napodobování nebo zesílení aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , zesílení funkce TRAF2 a receptorů, na které se váží v situacích, kde se taková zesílená funkce požaduje. Je to například anti-nádorová nebo imunostimulační aplikace, kde jsou nutné účinky indukované TRAF2. V tomto případě proteiny podle vynálezu, jejich analogy, fragmenty nebo deriváty, které posilují TRAF2 nebo účinek receptorů se mohou zavést do buněk standardními postupy, které jsou známy v oboru. Proteiny kódované klony DNA podle vynálezu jsou například intracelulární a měly by se zavést pouze do buněk, kde se účinek TRAF2 požaduje. Nezbytný je systém pro specifickou indukci těchto proteinů do buněk. Jedním způsobem, jak toho dosáhnout, je vytvoření rekombinantního zvířecího viru, například odvozeného od vakcinie, do něhož se zavedou následující dva geny: gen kódující ligand, který se váže na buněčné povrchové proteiny, jež buňky specificky exprimují, jako například protein gp120 viru AIDS(HIV), který se specificky váže na stejné buňky CD4 lymfocyty a příbuzné leukemie) nebo libovolný jiný ligand, který se specificky váže na buňky nesoucí receptor, který váže TRAF2 tak, že rekombinantní virový vektor se bude schopen na takové buňky vázat; a gen kódující proteiny podle vynálezu. Expresí proteinů vázajícího se na povrchu buňky na povrchu viru povede virus specificky k nádorové buňce nebo k jiné buňce, která nese receptor. Pak sekvence kódující proteiny se zavedou do buněk prostřednictvím viru a jejich exprese v buňkách povede k zesílení receptoru nebo účinku TRAF2, důsledkem čehož je požadovaný imunostimulační účinek v těchto buňkách. Konstrukce takového rekombinantního zvířecího viru se provádí standardním způsobem (který se například popisuje v publikaci Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Další možností je zavedení sekvencí kódovaných proteinů ve formě oligonukleotidů, které může buňka absorbovat a exprimovat.

(ii) mohou se použít k inhibici aktivity  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , k inhibici účinků TRAF2 nebo k inhibici receptoru, který se váže, např. v případě poškození tkáně jako je AIDS. Septický šok nebo při implantaci versus odmítnutí, kde se požaduje, aby se zablokoval indukovaný intracelulární signál. V této situaci je možné například zavést do buněk standardními postupy oligonukleotidy mající antisense kódující sekvenci proteinů podle vynálezu, které budou účinně blokovat translaci mRNA kódující proteiny a tak blokovat jejich expresi a tím dojde k inhibici nežádoucího účinku. V jiném případě se mohou použít jiné oligonukleotidy; oligonukleotidy, které brání jejich schopnosti vázat se na TRAF2 způsobem, který interferuje s možností navázání jiných molekul na tento protein, zatímco ve stejném časovém úseku nezprostředkovává žádnou aktivitu ani modulaci této molekuly. Na základě uvedených charakteristik uvedená molekula mohou poškodit interakci TRAF2 se svým přirozeným ligandem, čímž působí jako inhibitory schopné zrušit účinky zprostředkované TRAF2, jako je například aktivace  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Takové oligonukleotidy se mohou zavést do buněk za použití shora uvedeného rekombinantního viru, přičemž druhá sekvence nese ná virem je oligonukleotidová sekvence.

Jinou možností je použití protilátek specifických pro proteiny podle vynálezu za účelem inhibice jejich intracelulární signální aktivity.

Ještě dalším způsobem inhibice nežádoucího účinku je nedávno vyvinutý ribozymový přístup. Ribozymy jsou katalytické molekuly RNA, které specificky štěpí RNA. Ribozymy se mohou navrhovat tak, aby štěpily cílovou RNA, například mRNA kódující proteiny podle vynálezu. Takové ribozymy budou mít sekvenci specifickou pro mRNA proteinů a budou schopny s nimi vzájemně reagovat (komplementární navázání). Pak následuje štěpení mRNA, což vede ke snížení (nebo úplně ke ztrátě) exprese proteinů. Stupeň zeslabení exprese závisí na stupni ribozymové exprese v cílové buňce. Za účelem zavedení ribozymů do zvolených buněk (např. ty, které nesou proteiny vázající se na TRAF2) se může použít libovolný vhodný vektor například plazmid, zvířecí virové vektory (retrovirus), které se obvykle používají pro tyto účely (uvedeno v odst. (i) shora v textu, kde virus obsahuje jako druhou sekvenci cDNA kódující zvolenou ribozymovou

sekvenci) (metody v souvislosti s ribozymy se popisuje v publikaci Chen, C. J. et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 271–273; Zhao, J. J. and Pick, L. (1993) Nature 365: 448–451).

(iii) mohou se použít při izolaci, identifikaci a klonování jiných proteinů, které jsou schopny je vázat, například jiné proteiny, které se podílejí na intracelulárním signálním postupu, které jsou downstream TRAF2. Sekvence DNA kódující proteiny podle vynálezu se mohou například použít v kvasinkovém dvou-hybridním systému, ve kterém se kódované proteiny budou používat jako „návnada“ pro izolaci klonu a identifikaci jiných sekvencí z knihoven cDNA nebo genomové DNA („dravec“) kódující proteiny, které se mohou vázat na klony proteinů. Stejným způsobem se dá také stanovit, zda proteiny podle vynálezu se mohou vázat na jiné buněčné proteiny, například jiné receptory super-rodiny receptorů TNF/NGF.

(iv) Kódované proteiny, jejich analogy, fragmenty nebo deriváty se mohou také použít při izolaci, identifikaci a klonování jiných proteinů stejné třídy, to jsou ty, které se váží na TRAF2, nebo funkčně příbuzné proteiny a proteiny zahrnuté v intracelulárním signálním procesu. V této přihlášce se může použít shora uvedený kvasinkový dvouhybridní systém nebo se může použít právě vyvinutý systém, kde se používá Southernova hybridizace za nestringentních podmínek, po níž následuje PCR klonování (Wilks, A. F. et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1603–1607).

(v) Dalším přístupem využití kódovaných proteinů podle vynálezu, jejich analogů, fragmentů nebo derivátů je jejich použití v metodách afinitní chromatografie při izolaci a identifikaci jiných proteinů nebo faktorů, na které jsou schopny se vázat, např. proteiny příbuzné s proteinem TRAF2 nebo jiné proteiny nebo faktory, jež se podílejí na intracelulárním signálním procesu. Při tomto použití se mohou proteiny, jejich analogy, fragmenty nebo deriváty podle vynálezu jednotlivě připojit na matici afinitní chromatografie a pak se dostanou do kontaktu s buněčným extraktem nebo izolovaným proteinem nebo faktory, o kterých se předpokládá, že se podílí na intracelulárním signálním procesu. Pak následuje afinitní chromatografie. Jiné proteiny a faktory, které se váží na proteiny, jejich analogy, fragmenty nebo deriváty podle vynálezu se mohou eluovat, izolovat a charakterizovat.

(vi) Jak se popisuje shora v textu, proteiny, jejich analogy, fragmenty nebo deriváty podle vynálezu se mohou také použít jako imunogeny (antigeny) za vzniku specifických protilátek. Tyto protilátky se mohou také použít za účelem čištění proteinů podle vynálezu buď z buněčných extraktů nebo z transformovaných buněčných linií, které je, jejich analogy nebo fragmenty produkují. Dále se tyto protilátky mohou použít pro diagnostické účely při identifikaci poruch vzniklých abnormální funkcí receptorového systému, ve kterém fungují, například nadměrně aktivní nebo méně aktivní buněčné účinky indukované TRAF2. Pak takové poruchy mohou vzniknout na základě špatné funkce intracelulárního signálního systému, který zahrnuje proteiny podle vynálezu, takové protilátky budou sloužit jako důležitý diagnostický nástroj. Termín „protilátky“ zde zahrnují polyklonální protilátky, monoklonální protilátky (mAB), chimérické protilátky, antiidiotypické protilátky (anti-Id) k protilátkám, které se mohou značit v rozpuštěné nebo vázané formě, stejně jako jejich fragmenty, jako jsou například fragmenty Fab a F(ab')<sub>2</sub>, kterým chybí Fc fragment intaktních protilátek, které jsou schopny vázat antigen.

(vii) Protilátky zahrnující fragmenty protilátek podle vynálezu se mohou použít ke kvantitativní a kvalitativní detekci klonů podle vynálezu ve vzorcích. To se může uskutečnit imunofluorescenčními metodami, kde se používají fluorescenčně značené protilátky ve spojení se světelným mikroskopem, cytometrickým nebo fluorometrickým stanovením.

Protilátky (nebo jejich fragmenty) podle vynálezu se mohou použít při histologickém vyšetření, jako je imunofluorescenční nebo imunoelektronová mikroskopie za účelem *in situ* detekce klonů podle vynálezu. Detekce *in situ* se může uskutečnit vyjmutím histologického vzorku z pacienta a tento vzorek se označí protilátkami podle vynálezu. Protilátky (nebo fragment) se přednostně aplikují na vzorek v nadbytku. Použitím takového postupu je možné stanovit ne pouze přítomnost

klonů, ale také distribuci v testované tkáni. Při použití uvedeného vynálezu si odborníci musí uvědomit, že libovolná z různých histologických metod (jako je například barvení) se může modifikovat za účelem dosažení detekce *in situ*.

- 5 Takové testy klonů podle vynálezu v typickém případě obsahují inkubaci biologického vzorku, jako je biologická kapalina, tkáňový extrakt, čerstvě sebrané buňky, jako jsou lymfocyty nebo leukocyty nebo buňky, které se inkubovaly v tkáňové kultuře za přítomnosti detekovatelně značených protilátek, které mají schopnost identifikovat kódované proteiny a detekovat protilátky libovolným počtem metod, které jsou dobře známy v oboru.

- 10 (viii) Kódované proteiny podle vynálezu se mohou také použít jako nepřímé modulátory řady jiných proteinů účinkem jejich schopnosti vázat se na jiné intracelulární proteiny. Tyto jiné intracelulární proteiny se mohou vázat ještě na jiné intracelulární proteiny nebo intracelulární doménu transmembránového proteinu.

- 15 Za účely modulace těchto jiných intracelulárních proteinů nebo intracelulárních domén transmembránových proteinů se tyto proteiny podle vynálezu mohou zavést do buněk řadou způsobů, které se uvádějí shora v textu v odstavci (ii).

- 20 Také by se mělo poznamenat, že izolace, identifikace a charakterizace proteinů podle vynálezu se může uskutečnit za použití libovolné ze známých standardních testovacích postupů. Například jeden z těchto testovacích postupů je kvasinkový dvou-hybridní postup, který se použil při identifikaci proteinů podle vynálezu. Při izolaci, identifikaci a charakterizaci proteinů podle vynálezu nebo při izolaci, identifikaci a charakterizaci dalších proteinů, faktorů, receptorů atd., které jsou schopny se vázat na proteiny podle vynálezu, se mohou použít i jiné postupy, jako je afinitní chromatografie, hybridizace DNA atd., jak je známo v oboru.

- 25 Mohou se však použít samotné proteiny, o kterých se zjistilo, že se vážou na proteiny podle vynálezu, a to analogovým způsobem jako se proteiny podle vynálezu používaly při izolaci, identifikaci a charakterizaci jiných proteinů, faktorů atd., které jsou schopny se vázat na proteiny podle vynálezu. To znamená proteiny, které mohou reprezentovat faktory zahrnuté dále downstream v asociovaném signálním postupu nebo které mohou mít jejich signální aktivitu a proto reprezentují proteiny zahrnuté v odlišných signálních postupech.

- 35 Sekvence DNA a kódované proteiny podle vynálezu se mohou produkovat libovolným standardním postupem rekombinace DNA (např. Sambrook et al., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.), při kterém vhodné eukaryontní nebo prokaryontní hostitelské buňky se transformují vhodnými eukaryontními nebo prokaryontními vektory, které obsahují sekvence kódující proteiny. Vynález také zahrnuje takové expresivní vektory a transformované hostitele, které se mohou použít při produkci proteinů podle vynálezu. Jak se uvádí shora v textu, tyto proteiny také zahrnují jejich biologicky aktivní analogy, fragmenty a deriváty a tak vektory je kódující také zahrnují vektory kódující analogy a fragmenty těchto proteinů a transformování hostitele zahrnují ty, které takové analogy a fragmenty produkují. Deriváty těchto proteinů jsou deriváty produkované standardní modifikací proteinů nebo jejich analogů nebo fragmentů, které produkují transformování hostitelé.

- 40 Vynález se také týká farmaceutických kompozic při modulaci účinků zprostředkovaných TRAF2. Farmaceutické kompozice obsahující jako aktivní látku jednu nebo více ze skupiny zahrnující: (i) jednu nebo více sekvencí DNA podle vynálezu nebo její části subklonované do vhodného expresivního vektoru; (ii) protein podle vynálezu, jeho biologicky aktivní fragmenty, analogy, deriváty nebo jejich směs; (iii) rekombinantní zvířecí virový vektor kódující protein podle vynálezu, jeho ilogicky aktivní fragmenty, analogy nebo deriváty.

- 55 Farmaceutické kompozice se aplikují vzhledem k onemocnění, které se má léčit a v množství, které je výhodné pro pacienta v závislosti na tělesné váze a jiných úvahách, jak stanoví lékař.

Jak se uvádí shora jedno se specifických provedení proteinů vázajících se na TRAF podle vynálezu je protein vázající se na TRAF2. V závislosti na zjištění, že se v souladu s vynálezem protein NIK váže specificky na protein TRAF2 a jako takový je mediátorem/modulátorem TRAF2 a může a může tak zprostředkovat/modulovat aktivitu TRAF2 při aktivaci NF- $\kappa$ B a proto jeho možná úloha při které TRAF2 funguje nezávisle nebo ve spojení s jinými proteiny (např. receptory p55 TNF a p75 TNF, receptor FAS/Apo1, MORT-1, RIP a TRADD). Je důležité vytvořit léky, které mohou zesílit nebo inhibovat interakci TRAF2-NIK, jak se požaduje. Například je-li nutné zesílit buněčnou cytotoxicitu indukovanou TNF, je nutné inhibovat indukci NF- $\kappa$ B, inhibicí interakce TRAF2-NIK nebo inhibicí specificky TRAF2 a/nebo NIK. Je-li nutné inhibovat buněčnou cytotoxicitu indukovanou TNF bude potřeba zesílit indukci NF- $\kappa$ B zesílením interakce TRAF2-NIK nebo zesílením TRAF2 a/nebo NIK specifické indukce NF- $\kappa$ B. Existuje řada onemocnění, při kterých takové léky mohou být velkou pomocí. Mezi ně patří (uvedeno dále v textu) akutní hepatitida, při které dochází k akutnímu poškození jater, což pravděpodobně reflektuje na odumírání buněk jater zprostředkované receptorem FAS/APO1, což následuje po indukci ligandem Fas; autoimunně-indukovatelné odumírání buněk, jako jsou  $\beta$ -Langerhansovy buňky pankreatu, což vede k cukrovce; odumírání buněk v implantátech (například ledviny, srdce a játra); odumírání oligodendrocytů v mozku vede ke skleróze; a AIDS-inhibované odumírání T buněk, které způsobují proliferaci AIDS viru a proto onemocnění AIDS.

V takových případech je nutné inhibovat cestu buněčné cytotoxicity zprostředkovanou receptorem FAS/APO1 (apoptózu) a zesílit receptorem FAS/APO1 zprostředkovanou indukci NF- $\kappa$ B přes TRAF2 a interakci TRAF2-NIK. Jedna z cest by byla zvýšit množství NIK v buňkách nebo zvýšit množství TRAF2 a NIK tak, že se zvýší indukce aktivace NF- $\kappa$ B zprostředkovaná proteinem NIK nebo interakcí TRAF2-NIK, což znamená, že se posílí aktivace NF- $\kappa$ B a proto schopnost buněk přežít; nebo tak, že dojde k zesílení přímých nebo nepřímých interakcí mezi receptorem FAS/APO1 a TRAF2 (nebo TRAF-NIK), což vede ke snížení interakcí receptoru FAS/APO1 s buněčnými cytotoxickými mediátory (např. MAC1, schéma na obr. č. 2b), aby došlo ke zvýšení indukce aktivace NF- $\kappa$ B a schopnosti buněk přežít.

Naopak v případě nádorů a infikovaných buněk (uvedeno shora v textu) je nutné zvýšit cytotoxicitu zprostředkovanou receptorem FAS/APO1, aby došlo k zesílení odumírání buněk. V tomto případě bude nutné inhibovat interakce FAS/APO1 receptoru-TRAF2 (nebo TRAF2-NIK) a/nebo inhibovat přímo protein NIK a tím snížit indukci aktivity NF- $\kappa$ B.

Je možné, že protein NIK nebo spíše jeho izoformy, analogy nebo fragmenty mohou sloužit jako „přirozené“ inhibitory samotného proteinu NIK nebo interakce NIK-TRAF2 tak slouží jako inhibitory indukce aktivity NF- $\kappa$ B. Takové inhibitory se mohou použít jako specifické inhibitory, které se popisují shora v textu, například tyto inhibitory se používají, když je třeba zvýšit účinky buněčné toxicity TNF nebo ligandu receptoru FAS/APO1 za účelem zvýšit odumírání buněk. Ve skutečnosti, jak se uvádí dále v textu, se v souladu s vynálezem izolovaly různé analogy proteinu NIK a muteiny, které jsou kináza-deficitní analogy/muteiny a které jsou schopny blokovat indukci aktivace NF- $\kappa$ B zprostředkovanou receptory TNF, receptorem FAS/APO1, jejich asociovanými proteiny TRADD, RIP a MORT1, stejně jako zprostředkovanou receptorem IL-1 (jehož aktivace je prostřednictvím proteinu NIK, ale nezávislá na TRAF2); a také je zprostředkovaná bakteriálním endotoxinem (LPS), forbolmyristatacétátem a proteinem TAX HTLV-1. Jiné látky, jako jsou peptidy, organické látky, protilátky atd. se mohou také testovat za účelem získání specifických léků, které jsou schopny inhibovat interakci TRAF2 NIK nebo aktivitu proteinu NIK.

Podobným způsobem když je nutné zvýšit aktivitu NF- $\kappa$ B v různých situacích, jak se uvádí shora v textu, je možné zvýšit například množství proteinu NIK a/nebo TRAF2 v buňkách různými standardními metodami popsanými shora v textu. (např. zavedení DNA kódující protein NIK a/nebo TRAF2 do buněk za účelem indukovat zesílenou expresi nebo připravit vhodné formulace obsahující protein NIK a/nebo TRAF2 vhodnou pro přímou indukci do buněk nebo libovolné jiné způsoby podle vynálezu). Jiné látky, jako jsou peptidy, organické látky atd. se mohou testovat za

účelem získání specifických léků, které jsou schopny zvýšit aktivitu proteinu NIK nebo zesílit interakci TRAF2–NIK.

Neomezené příklady peptidových inhibitorů interakce NIK–TRAF2 jsou připraveny na základě předchozí studie peptidových inhibitorů ICE proteáz nebo proteáz podobných ICE, substrátové specifitě ICE a strategiích analýzy epitopu za použití peptidové syntézy. Zjistilo se, že na účinné štěpení peptidu pomocí ICE jsou minimální požadavky, když na levé straně místa štěpení jsou čtyři aminokyseliny s preferencí pro kyselinu aspartovou v pozici P1 a s metylaminem, který je podstatný na pravé straně v pozici P1 (Sleath, P. R. et al., (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 14526–14528; Howard, A. D. et al., (1991) *J. Immunol.* 147, 2964–2969; Thornberry, N. A. et al., (1992) *Nature* 356, 768–774). Navíc fluorogenní substrátový peptid (tetrapeptid), acetyl–Asp–Glu–Val–Asp–a–(4-methylcoumaryl–7–amid) zkráceně Ac–DEVD–AMC, koresponduje se sekvencí poly (ADP–ribóza) polymeráza (PARP), která je štěpena v buňkách krátce po stimulaci FAS–R, stejně jako jiné apoptotické postupy (Kaufmann, S. H. (1989) *Cancer Res.* 49, 5870–5878; Kaufmann, S. H. (1993) *Cancer Res.* 53, 3976–3985; Lazebnik, Y. A. et al., (1994) *Nature* 371, 346–347), a je štěpena účinně CPP32 (člen rodiny proteáz CED3/ICE) a proteáz MACH.

Podobně jako Asp v pozici P1 substrátu jeví se být důležité tetrapeptidy mající Asp jako čtvrtý aminokyselinový zbytek a u různých kombinací aminokyselin v prvních třech pozicích zbytků se může rychle testovat navázání na aktivní místa proteáz za použití například způsobu, který vyvinul Geysen (Geysen H. M. (1985) *Immunol. Today* 6, 364–369; Geysen H. M. et al., (1987) *J. Immunol. Meth.* 102, 259–274), kde velká řada peptidů na pevných podkladech se testovala za účelem zjištění specifických interakcí s protilátkami. Navázání proteáz MACH na specifické peptidy se mohou detekovat různými v oboru dobře známými metodami, jako je radioaktivní značení atd. Tato metoda podle Geysena se ukázala být schopna testovat nejméně 4000 peptidů v každém pracovním dnu.

Stejným způsobem se dá stanovit přesná vazebná oblast nebo oblast homologie, která stanovuje interakci mezi TRAF2 a NIK (nebo libovolným jiným proteinem a proteinem vázajícím se na TRAF) a pak se mohou testovat schopnost peptidů blokovat tuto interakci. Například syntetizované peptidy mají sekvenci podobnou s tou, kterou obsahuje vazebná oblast, nebo komplementární s tou, která může soupeřit s přirozeným proteinem NIK (nebo proteinem vázajícím se na TRAF) při navázání se na TRAF2 (nebo TRAF).

Vzhledem k tomu, že může být výhodné navrhnout peptidové inhibitory tak, že selektivně inhibují interakce TRAF2–NIK (nebo interakci protein vázající se na TRAF–TRAF), aniž interferují s fyzikálními procesy odumírání buněk, při kterých se účastní jiní členové intracelulární signální cesty, například MACH proteázy účastníci se odumírání buněk, které jsou členy rodiny proteáz CED3/ICE, peptidy vázající se na TRAF2 (nebo TRAF) nebo protein NIK (nebo proteiny vázající se na TRAF), v testu takovém jako je ten, co se popisuje shora v textu, se mohou dále syntetizovat jako fluorogenní substrátový peptid, za účelem testování selektivního navázání na takové jiné proteiny, aby došlo k selekci pouze těch, které jsou specifické pro TRAF2/NIK (nebo protein vázající se na TRAF/TRAF). Peptidy, které jsou specifické například pro TRAF2/NIK, se mohou modifikovat tak, aby se zvýšila buněčná permeabilita a inhibovala se aktivita TRAF2 a/nebo proteinu NIK a to buď vratně nebo nevratně. V publikaci Thornberry, N. A. et al., (1994) *Biochemistry* 33, 3934–3940 se uvádí, že tetrapeptid (acyloxy)methylketon Ac–Tyr–Val–Ala–Asp–CH<sub>2</sub>OC(O)[2,6–(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]Ph je potentní deaktivátor ICE. Podobně v publikaci Milligan, C. E. et al. (1995) *Neuron* 15, 385–393 se popisuje, že tetrapeptidové inhibitory, které zahrnují chloromethylketonové (nevratně) nebo aldehydové skupiny, (vratně) inhibují ICE. Navíc se zjistilo, že látka benzyloxykarboxyl–Asp–CH<sub>2</sub>OC(O)–2,6–dichlorbenzen (DCB) inhibuje ICE (Mashima et al., (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 907–915). Při podobném způsobu tetrapeptidy, které se selektivně váží například na TRAF2, nebo protein NIK se může modifikovat například aldehydovou skupinou, chloromethylketonem, (acyloxy)methylketonem nebo CH<sub>2</sub>OC(O)–DCB skupinou za vzniku peptidového inhibitoru aktivity TRAF2/NIK. Dále za účelem zlepšení permeability se mohou peptidy například dále chemicky modifikovat nebo derivatizovat, aby se

- zvýšila jejich průchodnost buněčnou membránou a umožnil se transport takových peptidů membránou až do cytoplazmy. V publikaci Muranishi, S. et al., (1991) Pharm. Research 8, 649 se popisuje derivatizující thyrotropin uvolňující hormon s kyselinou laurovou za vzniku lipofilního lauroylderivátu s dobrými charakteristikami penetrace buněčnými membránami. V publikaci
- 5 Zaccharia, S. et al., (1991) Eur. J. Pharmacol. 203, 353–357 se také popisuje oxidace metioninu na sulfoxid a nahrazení peptidu spojeného se svým ketomethylenizoesterem ( $\text{COCH}_2$ ), aby se umožnil transport peptidů skrz buněčnou membránu. Tyto modifikace a deriváty jsou také dobře známé v oboru.
- 10 Dále lékové nebo peptidové inhibitory, které jsou schopny inhibovat aktivitu například interakce NIK–TRAF2 a podobně interakce mezi proteiny TRAF a proteiny vázajícími se na TRAF, se mohou spojit nebo tvořit komplexy s molekulami, které umožňují jejich vstup do buněk.
- 15 Patent US 5 149 782 popisuje konjugaci molekuly za účelem transportu skrz buněčnou membránu s činidlem, jež snadno prochází membránou, jako jsou fúzogenní polypeptidy, polypeptidy tvořící iontový kanál, jiné membránové polypeptidy a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, např. kyselina myristová, kyselina palmitová. Tato činidla procházející membránou začleňují molekulové konjugáty do lipidové dvojvrstvy buněčných membrán a umožňují jejich vstup do cytoplazmy.
- 20 Low et al. v patentu US 5 108 921 popisuje dostupné metody pro transmembránové zavádění molekul, jako jsou například proteiny a nukleové kyseliny, jejichž mechanismem je receptorem zprostředkovaná endocytotická aktivita. Tyto receptorové systémy zahrnují ty, co rozeznávají galaktózu, mannózu, mannóza–6–fosforečnan, transferin, asialoglykoprotein, transkobalamin
- 25 (vitamin  $\text{B}_{12}$ ),  $\alpha$ –2–makroglobuliny, inzulin a jiné peptidové růstové faktory, jako je epidermální růstový faktor (EGF). Low et al. v patentu US 5 108 921 uvádí, že nutriční receptory, jako jsou receptory biotinu a folátu, se mohou s výhodou použít při zvýšení transportu skrz buněčnou membránu, což umožňuje pozice a multiplicita receptorů biotinu a folátu na povrchu membrán většiny buněk. Tak komplex vzniklý mezi sloučeninou, která se zavádí do cytoplazmy, a ligandem, jako je biotin nebo folát, se uvádí do kontaktu s buněčnou membránou nesoucí biotinový nebo folátový receptor až dojde k iniciaci trans–membránového transportního mechanismu zprostředkovaného receptorem, čímž se umožňuje vstup požadované látky do buňky.
- 30 Je známo, že ICE má schopnost tolerovat liberální substituce v pozici  $\text{P}_2$  a tato tolerance k liberálním substitucím vedla k vývoji potentního a vysoce selektivního afinitního značení obsahujícího biotin tag (Thornberry, N. A. et al., (1994) Biochemistry 33, 3934–3940). Pozice  $\text{P}_2$  stejně jako N–konec tetrapeptidového inhibitoru se může modifikovat nebo derivatizovat tak, že se přidá další molekula biotinu, aby se zvýšila permeabilita těchto peptidových inhibitorů skrz buněčnou membránu.
- 40 Navíc je v oboru známo, že fúzující požadovaná peptidová sekvence s vedoucí/signální sekvencí za vzniku „chimérického peptidu“ umožní, aby „chimérický peptid“ se transportoval skrz buněčnou membránu do cytoplazmy.
- 45 Peptidové inhibitory interakce proteinu vázajícího se na TRAF–TRAF například interakce TRAF–NIK podle vynálezu zahrnují peptidomimetické léky nebo inhibitory, u nichž se může rychle testovat navázání, například TRAF2/NIK, aby se umožnilo navrzení možná více stabilních inhibitorů.
- 50 Také je vhodné, aby stejné způsoby, které umožňují nebo zesilují transport peptidových inhibitorů skrz buněčné membrány, jak se diskutuje shora v textu, se daly aplikovat na proteiny vázající se na TRAF, například protein NIK, jeho analogy, fragmenty nebo jeho izoformy, stejně jako peptidy a proteiny, které mají intracelulární účinky.

S ohledem na protilátky, které se zmiňují zde v textu, termín „protilátky“ zahrnuje polyklonální protilátky, monoklonální protilátky (mAb), chimérické protilátky, anti-idiotypické (anti-Id) protilátky k protilátkám, které se mohou značit v rozpustné nebo v navázané formě, stejně jako jejich fragmenty, které vznikají známými metodami, jako je například enzymatické štěpení, peptidová syntéza nebo metody rekombinace.

Polyklonální protilátky jsou heterogenní populace molekul protilátek odvozených ze séra zvířat imunizovaných antigenem. Monoklonální protilátky obsahují v podstatě homogenní populaci protilátek specifických k antigenům, jejichž populace obsahují v podstatě stejný epitop vazebných míst. MAb se může získat způsoby, které jsou známy v oboru (Kohler and Milstein, Nature, 256: 495–497 (1975); patent US 4 376 110; Ausubel et al., eds. Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); a Colling et al., eds., Current Protocols in Immunology, Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience N. Y., (1992–1996). Takovými protilátkami může být libovolná třída imunoglobulinů zahrnující IgG, IgM, IgE, IgA, GILD a libovolná jejich podtřída. Hybridom produkující mAb podle vynálezu se může kultivovat *in vitro*, *in situ* nebo *in vivo*. Vysoce se preferuje produkce uvedenou metodou, protože umožňuje vznik vysokého titru mAb *in vivo* nebo *in situ*.

Chimérické protilátky jsou molekuly, jejichž různé části se odvozují z různých zvířecích specií, jako jsou ty, které mají variabilní oblast odvozenou z myších mAb a z konstantní oblasti lidského imunoglobulinu. Chimérické protilátky se primárně používají při redukcí imunogenicity při aplikaci a ke zvýšení výtěžků produkce, například tam kde myši mAb mají vyšší výtěžky z hybridomů, ale vyšší imunogenicitu u lidí, pak se používají lidské/myší chimérické mAb. Chimérické protilátky a způsoby jejich produkce jsou dobře známy v oboru, popisují se v publikacích: Cabbily et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273–3277 (1984); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851–6855 (1984); Boulianne et al., Nature 312: 643–646 (1984); Cabbily et al., přihláška evropského patentu EP 125 023 (uveřejněná 14. 11. 1984); Neuberger et al., Nature 314: 268–270 (1985); Taniguchi et al., přihláška evropského patentu EP 171 496 (uveřejněná 19. 2. 1985); Morrison et al., přihláška evropského patentu EP 173 494 (uveřejněná 5. 3. 1986); Neuberger et al., přihláška PCT WO 86/01533 (uveřejněná 13. 3. 1996); Kudo et al., přihláška evropského patentu EP 184 187 (uveřejněná 11. 6. 1986); Sahaga et al., J. Immunol. 137: 1066–1074 (1986); Robinson et al., mezinárodní patentová přihláška WO 87/02671 (uveřejněná 7. 5. 1987); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439–3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214–218 (1987); Better et al., Science 240: 1041–1043 (1988); a Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); a Colling et al., eds., Current Protocols in Immunology, Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience N. Y., (1992–1996).

Anti-idiotypické (anti-Id) protilátky jsou protilátky, které rozeznávají jediné determinanty, které se obecně spojí s protilátkou v místě, kde se váže antigen. Id protilátky se mohou připravit imunizací zvířat stejných specií a genetického typu (např. kmen myši) sloužící jako zdroj protilátek, pro které se anti-Id protilátky připravují. Imunizovaná zvířata budou rozeznávat a odpovídat na idiotypické determinanty imunizujících protilátek produkcí protilátek k těmto idiotypickým determinantům (anti-Id protilátky) (například patent US 4 699 880).

Anti-Id se mohou také použít jako „imunogen“ při indukci imunitní odezvy ještě dalších zvířat, přičemž vznikají anti-anti-Id protilátky. Anti-anti-Id protilátky mohou být epitopicky identické s původními epitopicky identické s původními protilátkami, které indukují anti-Id. Pak za použití protilátek k idiotypickým determinantům mAb je možné identifikovat jiné klony exprimující protilátky s identickou specifitou.

Monoklonální protilátky vzniklé proti proteinům vázajícím se na TRAF, jejich analogům, fragmentům a derivátům (např. protein NIK, jeho izoformy, analogy, fragmenty nebo deriváty) podle vynálezu se mohou použít při indukci anti-Id protilátek ve vhodných zvířatech, jako jsou BALB/c myši. Buňky sleziny takových imunizovaných myši se používají při produkci anti-Id hybridomů sekretujících anti-Id monoklonální protilátky. Dále anti-Id monoklonální protilátky

se mohou spojovat, aby nesly klíčový lumpethemocyanin (KLH) a mohly se použít při imunizaci dalších BALB/c myši. Séra z těchto myši budou obsahovat anti-anti-Id protilátky, které mají stejné vlastnosti navázání jako původní monoklonální protilátky specifické pro epitop prolinu vázajícího se na TRAF nebo jeho analogů, fragmentů a derivátů.

5

Anti-Id monoklonální protilátky tak mají své vlastní idiotypické epitopy nebo „idiotypy“ strukturně podobné epitopu, který se hodnotí jako GRB protein-a.

10

Termín „protilátky“ také zahrnuje obě intaktní molekuly, stejně jako jejich fragmenty, jako jsou například Fab a F(ab')<sub>2</sub>, které jsou schopny vázat antigen. Fragmentům Fab a F(ab')<sub>2</sub> chybí Fc fragment intaktních protilátek, nevydrží tak dlouho v oběhu a vykazují nižší nespecifické tkáňové navázání ve srovnání s intaktními protilátkami (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)).

15

Je výhodné, aby Fab a F(ab')<sub>2</sub> a jejich fragmenty protilátek se použily podle vynálezu při detekci a kvantifikaci proteinu vázajícího se na TRAF způsobem, který se zde popisuje v souladu s intaktními molekulami protilátek. Takové fragmenty se v typickém případě produkují proteolytickým štěpením za použití enzymů takových, jako je papain (při produkci fragmentů Fab) nebo pepsin (při produkci fragmentů F(ab')<sub>2</sub>).

20

Říká se, že protilátky jsou „schopny se vázat“ na molekulu, jestliže jsou schopny specificky reagovat s molekulou.

25

Termín „epitop“ znamená část libovolné molekuly, kterou je protilátka schopná vázat a kterou je také protilátka schopná rozeznat. Epitopy nebo „antigenní determinanty“ obvykle obsahují chemicky aktivní povrchové skupiny molekul takové jako aminokyseliny nebo vedlejší řetězce cukrů a mají specifické třírozměrné strukturní charakteristiky, stejně jako charakteristiky specifického náboje.

30

„Antigen“ je molekula nebo část molekuly, kterou jsou protilátky schopné vázat a která je navíc schopna indukovat zvířata k produkci protilátek vázajících se na epitop uvedeného antigenu. Antigen může mít jeden nebo více epitopů. Zde uvedená specifická reakce znamená, že indukuje, aby antigen reagoval vysoce selektivním způsobem se svou odpovídající protilátkou a ne s ostatními protilátkami, které mohou být evokovány jinými antigeny.

35

Protilátky, mezi něž patří fragmenty protilátek, použitelné podle vynálezu se mohou použít ke kvantitativní nebo kvalitativní detekci proteinu vázajícího TRAF (např. NIK) ve vzorku nebo při detekci přítomnosti buněk, které exprimují protein vázající se na TRAF podle vynálezu. To se může uskutečnit způsobem imunofluorescence za použití fluorescenčně značených protilátek (uvedeno dále v textu) ve spojení s metodami světelné mikroskopie, cytometrie nebo fluorometrické detekce.

40

Protilátky (nebo jejich fragmenty) použitelné podle vynálezu se mohou použít při histologických testech, jako je imunofluorescence nebo imunoelektronová mikroskopie při *in situ* detekci proteinu vázajícího se na TRAF podle vynálezu. Detekce *in situ* se může uskutečnit tak, že se na histologický vzorek z pacienta aplikují značené protilátky podle vynálezu. Protilátky (nebo fragment) přednostně vzniká aplikací nebo nadměrnou aplikací značených protilátek (nebo fragmentu) na biologický vzorek. Použitím takového postupu je možné stanovit ne pouze přítomnost proteinu vázajícího TRAF, ale také jejich distribuci v testované tkáni. Při použití tohoto vynálezu odborník musí předpokládat, že libovolná z těchto různých histologických metod (jako jsou barvicí postupy) se mohou modifikovat za účelem dosažení detekce *in situ*.

50

Takové testy za účelem zjištění proteinu vázajícího se na TRAF podle vynálezu v typickém případě zahrnují inkubaci biologického vzorku, jako je biologická tekutina, extrakt tkáně, čerstvě získané buňky, jako jsou lymfocyty nebo leukocyty nebo buňky, které se kultivovaly v tkáňových

kulturách v přítomnosti detekovatelně značených protilátek schopných identifikovat protein vázající se na TRAF, a detekci protilátek libovolnou z řady metod dobře známou v oboru.

Biologický vzorek se může nanést na podporu s pevnou fází nebo na nosič, jako je nitrocelulóza nebo na jiný pevný podklad nebo nosič, který je schopen immobilizovat buňky, buněčné partikule nebo rozpustné proteiny. Podklad nebo nosič se pak může promýt vhodnými pufrý a pak následně aplikace detekovatelně značených protilátek v souladu s vynálezem, jak se popisuje shora v textu. Podklad nebo nosič se pak může podruhé promýt pufrým, aby se odstranily nenavázané protilátky. Množství navázaných značek na uvedeném pevném podkladu nebo na nosiči se pak může detekovat běžnými způsoby. Termíny „podklad pevné fáze“, „nosič pevné fáze“, „pevný podklad“, „pevný nosič“, „podklad“ nebo „nosič“ se rozumí libovolný podklad nebo nosič schopný vázat antigen nebo protilátky. Dobře známé podklady nebo nosiče zahrnují sklo, polystyren, polypropylen, polyethylen, dextran, nylonamylázy, přirozené a modifikované celulózy, polyakrylamidy, gabbro a magnetit. Podstata nosiče může být buď v určitém rozsahu rozpustná nebo nerozpustná pro účely vynálezu. Podkladový materiál může mít libovolnou možnou strukturní konfiguraci, pokud připojená molekula je schopna se vázat na antigen nebo protilátku. Pak konfigurace podkladu nebo nosiče může být prostorová, jako například kuličky, cylindrická, jako je vnitřní povrch zkumavek nebo vnější povrch tyčinky. V jiném případě povrch může být rovný, jako je například list nebo testovací proužek atd. Preferovanými podklady nebo nosiči jsou polystyrenové kuličky. Odborník zná jiné nosiče vhodné pro navázání protilátek nebo antigenu nebo na základě vlastních experimentů dojde ke stejným závěrům.

Vazebná aktivita daných protilátek podle vynálezu, které se popisují shora v textu, se může stanovit podle dobře známých metod. Odborník je schopen na základě experimentů stanovit optimální a operativní testovací podmínky pro každé stanovení.

Do testů, je-li to nutné a vyžaduje-li to situace, se mohou přidat další kroky, jako je promývání, míchání, kolibání nebo filtrace.

Jedním ze způsobů, který může podle vynálezu detekovatelně značit protilátky je jejich připojení k enzymům a jejich použití v enzymatickém imunologickém testu (EIA). Tento enzym, když se později přidá vhodný substrát, bude reagovat takovým způsobem, že budou vznikat chemické látky, které se detekují, například spektrofotometricky, fluorometricky nebo vizuálně. Enzymy, které se mohou použít za účelem detekovatelného značení protilátek, zahrnují například malátdehydrogenázu, stafylokokovou nukleázu, delta-5-steroidizomerázu, kvasinkovou alkoholdehydrogenázu, alfa-glycerofosfatdehydrogenázu, triosafosfatizomerázu, křenovou peroxidázu, alkalickou fosfatázu, asparaginázu, glukózovou oxidázu, beta-galaktozidázu, ribonukleázu, ureázu, katalázu, glukóza-6-fosfatdehydrogenázu, glukooamylázu a acetylcholinesterázu. Detekce se může provést kolorimetrickými metodami, které používají pro enzymy chromogenní substrát. Detekce se také může provést vizuálním porovnáním rozsahu enzymatické reakce substrátu ve srovnání s podobně připravenými standardy.

Detekce se může uskutečnit za použití libovolného z různých imunologických testů. Například radioaktivním značením protilátek nebo fragmentů protilátek je možné detekovat R-PTPázou za použití radioimunologického testu (RIA). Test RIA je dobře popsán v publikaci: Laboratory Techniques end Biochemistry in Molecular Biology, Work, T. S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978), zvláště v kapitole s titulem „An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques“, jejímž autorem je Chard, T. Radioaktivní izotop se může detekovat například použitím počítače gama záření, scintilačního počítače gama záření nebo autoradiografií.

Také je možné označit protilátky v souladu s vynálezem fluorescenční látkou. V případě, že fluorescenční látkou značené protilátky jsou vystaveny působení světla s vhodnou vlnovou délkou, jejich přítomnost se pak může detekovat fluorescenčně. Mezi nejběžnější užívané fluorescenční značící látky patří fluorescein, izothiokyanát, rodamin, fykoerytrin, pykocyanin, allofykocyanin, o-ftaldehyd a fluorescein.

Protilátky se mohou také detekovatelně značit za použití kovů emitujících fluorescenční záření, jako je  $^{152}\text{E}$  nebo jiné série lantanidů. Tyto kovy se mohou navázat na protilátky za použití takových kovových chelátových skupin, jako je kyselina diethylenetriaminpentaocetová (ETPA).

Protilátky se mohou také detekovatelně značit párováním s chemoluminiscenční sloučeninou. Přítomnost protilátek označených chemoluminiscenční látkou se pak stanoví detekcí přítomnosti luminiscence, která se uvolňuje během průběhu chemické reakce. Příklady zvláště použitelných chemoluminiscenčních značících sloučenin jsou luminol, izoluminol, teromatský akridinium-ester, imidazol, soli akridinia a aoxylátester.

Podobně se může používat ke značení protilátek podle vynálezu bioluminiscenční látka. Bioluminiscence se jako typ chemoluminiscence nachází v biologických systémech, kde katalytický protein zvyšuje účinnost chemoluminiscenční reakce. Důležitými bioluminiscenčními látkami jsou pro účely značení luciferin, luciferáza a aequorin.

Molekula protilátek podle vynálezu se může adaptovat za účelem využití v imunometrických testech, které jsou také známy jako „dvoustranný“ nebo „sendvičový“ test. Při typickém imunometrickém testu se určité množství neznačených protilátek (nebo fragmentů protilátek) naváže na pevný podklad nebo nosič a přidá se určité množství detekovatelně značených rozpustných protilátek, což umožňuje detekci a/nebo kvantifikaci ternárních komplexů vytvořených mezi protilátkou na pevné fázi, antigenem a značenou protilátkou.

Typické a preferované imunometrické testy zahrnují „forward“ testy, při kterých protilátka vázaná na pevnou fázi přichází do kontaktu s testovaným vzorkem, přičemž dochází k extrakci antigenu ze vzorku za vzniku binárního komplexu protilátky na pevné fázi–antigen. Po vhodné inkubační době se pevný podklad nebo nosič promyje, aby se odstranil zbytek kapalného vzorku, který obsahuje nezreagovaný antigen. Pak dochází ke kontaktu s roztokem, který obsahuje neznámé množství značených protilátek (které fungují jako „reportní molekuly“). Po druhé inkubaci protilátka vytvoří komplex s antigenem navázaným na pevný povrch nebo nosič prostřednictvím neznačených protilátek. Pevný podklad nebo nosič se promyje podruhé, aby se odstranily nezreagované protilátky.

U jiného typu sendvičového testu, kde je možné použít antigeny podle vynálezu, se používají tzv. „souběžné“ a „reverzní“ testy. Souběžný test zahrnuje jediný stupeň inkubace, při kterém se protilátky vážou na pevný podklad nebo nosič a obě značené protilátky se přidávají k testovanému vzorku ve stejném čase. Po inkubaci se pevný podklad nebo nosič promyje a tím se odstraní zbytek kapalného vzorku a značené protilátky, které nejsou v komplexu. Přítomnost značených protilátek asociovaných s pevným podkladem nebo nosičem se pak stanoví jako u běžného „forward“ sendvičového testu.

Při „reverzním“ testu se do kapaliny vzorku postupně přidává první z roztoků značených protilátek, pak po vhodné době inkubace následuje přidání neznačených protilátek vázaných na pevném podkladu nebo nosiči.

Po druhé době inkubace se pevná fáze promyje běžným způsobem, aby se odstranil zbytek testovaného vzorku a roztok nezreagovaných značených protilátek. Stanovení značených protilátek asociovaných s pevným povrchem nebo nosičem pak proběhne jako „souběžný“ a „forward“ test.

Jak se uvádí shora v textu vynález se také týká farmaceutických kompozic, které obsahují rekombinantní vektory zvířecích virů kódující proteiny vázající se na TRAF. Tyto vektory také kódují povrchový virový protein schopný se specificky vázat na povrchové proteiny cílových buněk (např. rakovinové buňky) tak, aby řídily inzerci sekvencí proteinu vázajícího se na TRAF do buněk. Další farmaceutické kompozice podle vynálezu obsahují jako aktivní látku (a) oligonu-

kleotidovou sekvencí kódující anti-sense sekvenci sekvence proteinu vázajícího se na TRAF nebo (b) léčiva, která blokují interakci proteinu vázajícího se na TRAF-TRAF.

5 Farmaceutické kompozice podle vynálezu zahrnují podstatné množství aktivní ingredience, aby se dosáhlo požadovaného účelu. Navíc farmaceutické kompozice mohou obsahovat vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče, které obsahují excipienty a pomocná činidla, která umožňují zpracování aktivních látek do přípravků, která se mohou použít pro farmaceutické účely a která mohou stabilizovat takové přípravky při aplikaci subjektu.

10 Očekává se, že protein vázající se na TRAF a jeho izoformy nebo izotopy se bude exprimovat v různých tkáních v různé síle a zřejmě také s různými patrnými izotypy, než je tomu u různých jiných proteinů, které se podílejí na intracelulární signální cestě, jak se uvádí v uvedených patentových přihláškách. Tyto rozdíly mohou způsobovat tkáňové specifické rysy odezvy na Fas/APO1-ligand a TNF. Jako v případě jiných homologů CED3/ICE (Wang, L. et al., (1994) 15 Cell 78, 739-750); Alnemri, E. S. et al., (1995) J. Biol. Chem. 270, 4312-4317) se už dříve ukázalo, že (v dříve uvedených patentových přihláškách) MACH izoformy, které obsahují nekompletní oblasti CED3/ICE (například MACH $\alpha$ 3) mají inhibiční účinek na aktivitu společně exprimovaných molekul MACH $\alpha$ 1 nebo MACH $\alpha$ 2 $\alpha$ ; také se zjistilo, že blokují indukcí Fas/APO1 a p55 R. Expres takových inhibičních izoform v buňkách může zahrnovat mechanismus autoochrany buňky proti cytotoxicitě zprostředkované Fas/APO1 a TNF. Široká heterogenita izoform 20 MACH, které značně překračují hodnoty pozorované u jiných proteáz rodiny CED3/ICE, by měla umožnit zvláště dobré ladění funkce aktivních MACH izoform.

25 V souladu s vynálezem se také izolovaly analogy/muteiny jednoho z proteinů vázajícího se na TRAF, jmenovitě protein vázající se na TRAF2 NIK. Tyto analogy/muteiny proteinu TRAF (uvedeno shora v textu a v příkladech dále v textu) jsou inhibitory indukce aktivace NF- $\kappa$ B zprostředkované proteinem NIK a receptory TNF, receptorem Fas/APO1, jejich příbuznými proteiny, receptorem IL-1 a jinými činidly. Protože, jak se uvádí shora v textu, proteiny vázající se na TRAF nebo možné izoformy mohou mít různé účinky v různých tkáních s ohledem na jejich 30 interakci s proteiny TRAF a tím i vliv na aktivitu proteinů TRAF nebo intracelulární signalizaci zprostředkovanou proteiny TRAF.

Je také možné, že některé z možných izoform proteinu vázajícího se na TRAF mají ještě další funkce. Například protein NIK nebo některé analogy proteinu NIK nebo jeho izoformy mohou 35 také působit jako doky pro molekuly, které se podílejí na jiných necytotoxických účincích například receptory Fas/APO1 a TNF prostřednictvím interakce s TRAF2 nebo dokonce nezávisle na TRAF2.

40 Díky jedinečné schopnosti receptorů Fas/APO1 a TNF způsobovat odumírání buněk, stejně jako schopnosti receptorů TNF způsobovat další tkáň poškozující aktivity, pak každá odchylka ve funkci uvedených receptorů může poškodit organismus. Jak nadměrné tak i nedostatečné fungování těchto receptorů se podílí na patologických manifestacích různých onemocnění (Vassalli, P. (1992) Ann. Rev. Immunol. 10, 411-452; Nagata, S. and Gostein, P. (1995) Science 267, 1449-1456). Identifikace molekul, které se podílejí na signalizační aktivitě receptorů a stanovení 45 způsobů modulace aktivity těchto molekul, může řídit nové terapeutické přístupy. Vzhledem k očekávané důležité roli proteinů TRAF, například TRAF2, a vzhledem k interakcím proteinu vázajícího se na TRAF-TRAF, například interakce TRAF2-NIK, při aktivaci NF- $\kappa$ B zprostředkované Fas/APO1 a TNF, se zdá zvláště důležité vytvořit léky, které mohou blokovat interakci proteinu vázajícího se na TRAF-TRAF, například interakce TRAF2-NIK, v případě, že je nutné 50 usmrtit buňky (inhibicí aktivace NF- $\kappa$ B), a opačně, je-li nutné ochránit buňky, tato interakce by měla být zesílena, aby se také zesílila aktivace NF- $\kappa$ B).

Vynález také zahrnuje proteiny nebo jiné ligandy, které se mohou vázat na proteiny vázající se na TRAF podle vynálezu a tak modulovat/zprostředkovat aktivitu proteinů vázajících se na TRAF. 55 Takové proteiny nebo ligandy se mohou testovat, izolovat a produkovat libovolnou z uvedených

metod. Například se zde může izolovat řada nových ligandů, které zahrnují proteiny schopné vázat se na proteiny NIK podle vynálezu (takové nové proteiny/ligandy vylučují známý TRAF2 a pravděpodobně I $\kappa$ B, jestliže se protein NIK skutečně váže na I $\kappa$ B).

- 5 Jak se v detailech popisuje shora v textu takové nové proteiny/ligandy vázající se na protein, který se váže na TRAF, například proteiny vázající se na protein NIK, mohou sloužit jako například inhibitory nebo zesilovače aktivity zprostředkované proteinem NIK nebo aktivity zprostředkované například interakcí TRAF2–NIK a jako takové budou mít důležitou úlohu v různých patologických a jiných situacích, jak se detailně popisuje shora v textu. Jiná funkce proteinů/li-
- 10 gandů vázajících se na protein, který se váže na TRAF, je sloužit jako specifická činidla při čištění proteinů vázajících se na TRAF, například při afinitní chromatografii. Tyto nové vázající se proteiny/ligandy jsou připojeny na vhodné chromatografické matrice, aby vytvořily pevný nebo afinitní podklad/matrici, skrz který roztok, extrakt nebo podobně, obsahující proteiny vázající se na TRAF, například protein NIK, bude procházet a tímto způsobem dojde k jeho čištění.
- 15 Takové metody afinitní chromatografie jsou dobře známy v oboru.

- Podobně všechny shora uvedené proteiny vázající se na TRAF, analogy, fragmenty, izoformy a deriváty podle vynálezu se mohou použít při čištění afinitní chromatografií různých proteinů TRAF, na které se váží. Například proteiny vázající se na TRAF, na které se váží. Například
- 20 proteiny vázající se na TRAF, jako je protein NIK, a analogy, fragmenty a muteiny proteinu NIK (uvedeno v příkladech dále v textu) se mohou použít při čištění afinitní chromatografií TRAF2. Proto stejným způsobem, jako u proteinu NIK, analogů/muteinů podle vynálezu (uvedeno v příkladech dále v textu) za použití metod a libovolných jiných ekvivalentních metod, které jsou odborníkovi zřejmé, se izolovaly a produkovaly libovolné jiné proteiny vázající se na TRAF2.
- 25 Taková metoda pro identifikaci a produkci těchto proteinů vázajících se na TRAF, například proteiny vázající se na TRAF2, budou zahrnovat testovací krok, při kterém protein TRAF (například TRAF2) nebo přinejmenším jeho specifická část (např. část proteinu TRAF2 mezi aminokyselinami 222 až 501) se použije jako substrát nebo jako „návnada“ pro získání proteinů nebo libovolného jiného ligandu schopného se na něj vázat; pak následují kroky identifikující a cha-
- 30 rakterizující takto získané proteiny; a uvedené proteiny/ligandy se produkují ve v podstatě izolovaných a čištěných formách. Všechny tyto kroky jsou v oboru dobře známy a popisují se detailněji shora v textu a dále v textu.

Mělo by se také poznamenat, že postupy:

- 35 i) dvou–hybridní test a dvou–hybridní  $\beta$  galaktozidázový expresivní test; (ii) indukovaná exprese, metabolické značení a imunoprecipitační proteiny; (iii) *in vitro* navázání; (iv) odhad cytotoxicity; a (v) northernova a sekvenční analýza, stejně jako jiné postupy používané v následujících příkladech se popisují detailněji v předchozích publikacích s ohledem na jiné intracelulární signální proteiny a cesty (uvedeno například v publikacích Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D., (1995b). J. Biol. Chem. 270, 7795–7798; a Boldin, M. P., et al., (1996) Cell 85, 803–815; Boldin, M. P. et al., (1995a) J. Biol. Chem. 270, 337–341). Tyto postupy se také popisují v izraelských přihláškách vynálezů č. 114615, 114986, 115319, 116588, 117932 a 120367, stejně jako v odpovídající přihlášce PCT/US 96/10521.
- 45

#### Přehled obrázků na výkresech

Na obrázku č. 1 je zobrazen diagram struktury molekuly TRAF2.

- 50 Obrázek č. 2a až b zobrazuje schematické diagramy ilustrující stejné proteiny, které se podílejí na aktivaci NF $\kappa$ B, mezi něž patří nové proteiny vázající se na TRAF podle vynálezu (např. NIK). V části (a) je uvedeno částečné schéma, v části (b) je uvedeno kompletní schéma.;

Na obrázcích 3a až b je uvedena nukleotidová sekvence 5'-konce klonu 9 (a) a dedukovaná aminokyselinová sekvence jím kódovaná (b);

Obrázek č. 4 ukazuje nukleotidovou sekvenci klonu 10;

Obrázky č. 5a až b ukazují nukleotidovou sekvenci klonu 15 (a) a dedukovanou aminokyselinovou sekvenci jím kódovanou (b);

Obr. č. 6 ukazuje nukleotidovou sekvenci a dedukovanou aminokyselinovou sekvenci proteinu NIK; a

Obr. č. 7 ukazuje uspořádání sekvence proteinu NIK se sekvencí myši proteinové kinázy mMEKK (myši MAPK a ERK kináza kináza) a řadu jiných kináz. Označeny jsou oblasti odpovídající konzervativním motivům I až IX v proteinových kinázách.

### Příklady provedení vynálezu

#### Materiály a metody

##### i) knihovny cDNA:

###### a) knihovna cDNA B-buněk

Použila se knihovna iniciovaná oligo-dT zkonstruovaná z lidských B buněk (Durfee, T. et al., (1993) Genes Dev. 7: 555–569). Knihovna cDNA se začlenila do restrikčního místa XhoI vektoru pSE1107 založeného na vektoru pACT ve fúzi s aktivační doménou GAL4.

###### b) knihovna $\lambda$ gt10 cDNA varlete

Použila se knihovna cDNA z lidského varlete. Knihovna je náhodně iniciovaná nukleotidy a průměrná velikost inzertu je 200 až 400 bp.

##### ii) Kmeny kvasinek

Jako hostitelské kmeny pro transformaci a testování se použily dva kvasinkové kmeny: kmen HF7c, který se použil ve dvou-hybridním testu a kmen SFY526, který se použil v b-galaktosidázových testech. Oba kmeny nesou auxotrofní markery *trp1* a *leu2*, tyto kvasinkové kmeny nemohou růst v minimálním syntetickém médiu, které neobsahuje tryptofan a leucín, aniž nejsou transformovány plazmidem nesoucím divoké verze těchto genů (*TRP1*, *LEU2*). Dva kvasinkové kmeny nesou deleční mutace v genech *GAL4* a *GAL80* (mutace *gal4* až 542 a *gal80* až 538).

Kmeny SFY526 a HF7c nesou ve svém genotypu reportér *lacZ*; genom kmene SFY526 se fúzoval s UAS a s částí TATA promotoru *GAL1* a genom kmene HF7c obsahuje tři kopie 17-mérové sekvence *GAL4* a části TATA promotoru *CYC1*, které jsou fúzované s *lacZ*. Jak *GAL1* UAS a 17-méry *GAL4* odpovídají za transkripční aktivátor *GAL4*. Navíc kmen HF7c nese reportér *HIIS3* fúzovaný s UAS a TATA částí promotoru *GAL1*.

##### iii) Klonování lidského TRAF2.

Lidský TRAF2 se klonoval pomocí PCR z knihovny cDNA HL60 (aby se získala sekvence TRAF2, detaily se popisují v publikacích Rothe, M., Wong S. C., Henzel, W. J. and Goeddel, D (1994) Cell 78: 681–692; Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995a), Science 269, 1424–1427; Cheng, G. and Baltimore, D. (1996) Genes Dev. 10, 963–973; Hsu, H.,

Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. (1996) Cell 84, 299–308; a Wallach, D. (1996) Eur. Cytokine Net. 7, 713–724). Používaly se primery: a) 30–mérový forward primer se sekvencí CAGGATCCTCATGGCTGCAGCTAGCGTGAC odpovídající kódující sekvenci hTRAF2, která začíná v kodonu pro první metaonin (podtrženo) a zahrnující linker s restrikčním místem BamHI; b) 32–mérový reverzní primer se sekvencí GGTCGACTTAGAGCCCTGTCAGGTCC-ACAATG, který zahrnuje terminační kodon (podtrženo) genu hTRAF2 a ve svém linkeru restrikční místo Sall. Program PCR zahrnuje počáteční denaturační krok 2 minuty při teplotě 94 °C, pak následuje 30 cyklů teplota 94 °C po dobu 1 minuty, teplota 64 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 40 vteřin. Amplifikovaný lidský TRAF2 se pak začlenil do restrikčních míst BamHI až Sall vektoru pGBT9 ve spojení s GAL4 DNA vazebnou doménou.

#### iv) Dvou–hybridní test knihovny B–buněk

Dvou–hybridní test je metoda (popis uvedený v citovaných publikacích shora v textu) používaná za účelem identifikace faktorů, které jsou spojeny s určitou molekulou sloužící jako návnada. TRAF2 podle vynálezu se pak klonoval do vektoru pGBT9, který slouží jako návnada. TRAF2 se exprimoval společně s testovanou knihovnou cDNA B–buňky v kmeni kvasinek HF7c. TRAF2 klonovaný pomocí PCR se spojil rekombinantní fúzí s doménou vázající DNA CAL4 a testovaná knihovna cDNA se fúzovala s aktivační doménou GAL4 ve vektoru pSE1107. Reportní gen v kmenech HF7c a HIS3 se fúzoval s upstream aktivující sekvencí (UAS) promotoru GAL1, který odpovídá transkripčnímu aktivátoru GAL4. Transformanty, které obsahovaly oba plazmidy pGBT9 a PSE1107, se izolovaly z kultury na plotnách, které neobsahují tryptofan a leucin. Z ploten bez tryptofanu, leucinu a histidinu a s obsahem 50 mM 3–aminotriazolu (3AT) se ve druhém stupni izolovaly pozitivní klony, které exprimují vzájemně reagující dvou–hybridní proteiny, a proto aktivovaly GAL1–HIS3.

#### v) $\beta$ –galaktozidázový test

Pozitivní klony, které se izolovaly ve dvou hybridním testu, se podrobily barevné detekci pomocí lacZ v kvasinkových buňkách kmene SFY526 podle instrukcí uvedených v publikaci Clontech Laboratories' manual (detailní informace se popisují shora v textu v uvedených publikacích a v patentových přihláškách). Transformanty se kultivovaly při teplotě 30 °C po dobu 2 až 4 dnů, až dosáhly velikosti okolo 2 mm v průměru, pak se přenesly na filtry Whatman. Filtry se zmrazily/rozmrazily za účelem dosažení průchodnosti buněčných membrán, pak se namočily do pufru (16,1 mg/ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5,5 mg/ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,75 mg/ml  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , pH=7) obsahující 0,33 mg/ml X–gal a 0,35 mM  $\beta$ –merkptoethanol. U kolonií se sledoval vývoj modré barvy, což je indikace zavedení  $\beta$ –galaktozidázy.

#### vi) Exprese klonované cDNA.

Zkonstruovaly se dva druhy expresivních vektorů:

- a) Vektory založené na pUHD10–3 obsahující otevřený čtecí rámec (ORF) buď klonu 9, 10 nebo 15 ve fúzi s epitopem hemeaglutininu (HA).
- b) Vektor založený na pUHD10–3, do kterého se zavedla sekvence oktapeptidu FLAG, právě před klonovaný TRAF2, vektor se pojmenoval FLAG/B6/TRAF2.

Konstrukce obsahující ORF klonu 9, 10 nebo 15 se transfekovaly do buněk Hella–Bujard (tyto buňky se popisují v publikaci Gossen, M. and Bujard, M. (1992) PNAS 89: 5547–5551) buď samostatně nebo se ko–transfekovaly s vektorem FLAG/B6/TRAF2 za použití standardní metody s fosforečnanem vápenatým (metoda se popisuje například v publikaci Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987–1995).

## vii) Luciferázový test.

V typickém případě se shromáždilo  $5 \times 10^5$  transferovaných buněk, promyly se třikrát chlazeným PBS a resuspendovaly se ve 400  $\mu$ l extrakčního pufru (0,1 M  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH=7,8; 1 mM DTT). 5 Lyze buněk se dosáhlo třemi cykly zmrazením a rozmrazením v kapalném dusíku. Buněčný odpad se odstranil centrifugací (5 minut při 10 000 x g). V luciferázovém testu se přidalo do 50  $\mu$ l lyzátu 200  $\mu$ l luciferázového pufru (25 mM glycylglycin, 15 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH=7,8, 15 mM  $MgSO_4$ , 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1 mM DTT). Do reakce se následně přidalo 100  $\mu$ l 0,2 mM D-luciferinu, 25 mM glycylglycinu, 1 mM DTT. Aktivita luciferázy se stanovila 10 odečtem emise světla za použití luminometru Lumitron nastaveného na 10 vteřin. (popisuje se v publikacích uvedených shora v textu).

## Příklad 1: Klonování nových klonů 9, 10 a 15.

15 V knihovně cDNA připravené z B-buněk se testovaly proteiny, které jsou asociované s TRAF2 za použití dvouhybridní metody, jak se popisuje v části Materiály a metody v odst. (iv). Doména vázající DNA GAL4 a doména aktivující transkripci se spojila pouze u transformantů, které exprimují jak TRAF2 tak i protein schopný reagovat s TRAF2. Výsledkem byla aktivace a exprese reportního genu, v tomto případě HIS3 fúzoval s TATA částí promotoru GAL1.

Na základě testu se izolovalo 200 klonů, které byly schopny růst na plotnách bez Trp, Leu a His s 3AT. Ze 165 náhodně vybraných pozitivních klonů se připravila DNA, která se dočasně transfekovala do kvasinkového kmenu SFY526 spolu s TRAF2 klonovaným do vektoru pGBT9. Test 25  $\beta$ -galaktozidázové aktivity proběhl na transformovaných kvasinkových koloniích kmene SFY526, jak se popisuje v části Materiály a Metody v odst. (v) Modrá barva indikovala kvasinkové kolonie, které obsahují cDNA kódující protein nebo polypeptid, který váže TRAF2.

30 Výsledky dvou hybridního testu; schopnost izolovaných klonů růst na 3AT plotnách a indukovat LacZ, jak se měří barevným testem, jsou uvedeny v tabulce č. 1. Dva z testovaných pozitivních klonů nesly cDNA kódující známé proteiny; TRAF2, které jsou schopny se mezi sebou spojovat a tvořit homodiméry a beta receptor lymfotoxinu, jejichž intracelulární domény jsou schopny se vázat na TRAF2. Tři z klonovaných cDNA (klony 9, 10 a 15) jsou nové.

35 Pozitivní klony se dále testovaly v testech pro specifitu navázání. Testovala se jejich interakce s irelevantní návnadou. Jak se uvádí v tabulce č. 2, pouze klony 9 a 10 reagovaly s TRAF2 a nenavázaly se ani na jediný z řady irelevantních testovaných proteinů. Klon 15 na druhé straně se neváže na protein MORT1, ani na intracelulární receptory p55 a p75 TNF, ale slabě se váže na lamin a cyklin D.

40 Za účelem zúžit oblast molekuly TRAF2, která vzájemně reaguje s klony 9, 10 a 15, se připravily dvě další konstrukce. Jedna konstrukce obsahuje N-terminální část molekuly TRAF2, aminokyseliny 1 až 221, která zahrnuje motivy „ring finger“ a „zinc finger“. Druhá konstrukce zahrnuje pouze C-terminální část molekuly aminokyseliny 222 až 501, která zahrnuje oblast-TRAF a dalších 42 aminokyselin. Tyto dvě konstrukce slouží jako návnada při dvou-hybridním testu. 45 Výsledky jasně naznačují, že zatímco klony 9, 10 a 15 vzájemně nereagují s konstrukcí obsahující aminokyseliny 1 až 221 molekuly TRAF2, všechny se váží na C-terminální konstrukci obsahující oblast TRAF se stejnou účinností jako se váží na molekulu TRAF2 v plné délce.

Tabulka č. II: Výsledky dvou hybridního testu, kde se používá TRAF2 jako návnada a při kterém se izolovaly klony 9, 10 a 15.

| Schopnost růstu na 50 mM 3AT | Barevný test (min.) | ID/označení klónu, jak se definuje jeho sekvenováním | Číslo nezávislých klónů |
|------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------|-------------------------|
| +++                          | 10 min              | TRAF2                                                | 150                     |
| ++                           | 20 min              | nový klón č. 9                                       | 6                       |
| +++                          | 15 min              | nový klón č. 10                                      | 2                       |
| ++++                         | 10 min              | beta receptor lymfotoxinu                            | 2                       |
| +                            | 15 min              | nový klón č. 15                                      | 5                       |

5

Tabulka č. III: Testy specifity  
(interakce s irelevantními návnadami ve dvou-hybridním testu)

10

| Klón     | klon 9 | klon 10 | klon 15 |
|----------|--------|---------|---------|
| návnada  |        |         |         |
| LAMIN    | -      | -       | +       |
| cyklin D | -      | -       | +       |
| p75-IC   | -      | -       | -       |
| p55-IC   | -      | -       | -       |
| MORT1    | -      | -       | -       |
| TRAF2    | +++    | +++     | +++     |

15

20

Po PCR amplifikaci cDNA klonu 10, se klonovala plná délka cDNA z knihoven cDNA získaných z RNA lidských tkání. Tento protein se označil na základě skutečnosti, že obsahuje oblast proteinové kinázy, jako protein NIK vhodný pro „kinázu indukující NF- $\kappa$ B“ (uvedeno dále v textu). Je nutné poznamenat, že sekvence klonu 10, (na základě počáteční analýzy, která se provedla před tím, než se získal protein NIK pomocí PCR) kóduje protein původně označený jako NMPI (uvedeno v publikaci IL 117800). Zjistilo se, že tento NMPI nebo protein kódovaný klonem 10 má sekvence odpovídající konzervativním motivům I až XI, které charakterizují Ser/Thr proteinové kinázy.

Příklad 2: Sekvenování nových klónů.

25

Izolovaly se tři nové cDNA klony (klony 9, 10 a 15) a amplifikovaly se v bakteriích E. coli a sekvenovala se jejich DNA. Zjistilo se, že všechny tři klony jsou částečné cDNA klony.

Celková délka klónů 9, 10 a 15 byla přibližně 2000, 2 00 a 1300 párů bází.

30

Obrázky 3 a 5 ukazují sekvenovanou část klónů 9 a 15 a obrázek č. 4 zobrazuje celou sekvenci klonu 10.

Obrázky č. 5a až b ukazují celou nukleotidovou sekvenci klonu 15 sekvenovanou z obou konců 5' a 3' (a) a jimi kódované dedukované aminokyseliny (b). Zjistilo se, že klon 15, který je částečně klon cDNA, kóduje protein obsahující 172 aminokyselin.

- 5 Klony 9 a 15 jsou částečné klony, kterým chybí většina jejich 5'konce kódujících sekvencí DNA. Všechny dedukované aminokyselinové sekvence, které jsou zobrazeny na obr. č. 3b, 4b a 5b začínají prvním nukleotidem klonu.

- 10 Sekvence analyzovaného klonu 10 (částečný cDNA klon) kóduje protein nazývaný NMP1, jak se uvádí shora v textu, který obsahuje motivy Ser/Thr proteinové kinázy. Celá délka klonu cDNA získaného pomocí PCR za použití klonu 10, jak se uvádí shora v textu, ukazuje novou kinázu NIK vážající se na TRAF2, jak se uvádí shora v textu.

- 15 Celá nukleotidová sekvence proteinu NIK a její dedukovaná aminokyselinová sekvence je zobrazena na obr. č. 6, kde je potvrzen iniciátor ATG na pozici nukleotidu č. 232 a kde terminační kodon na pozici nukleotidu č. 3073 je označen hvězdičkou. Zcela sekvenovaný klon proteinu NIK na obr. č. 6 zahrnuje 4 596 nukleotidů, které obsahují kódující sekvenci proteinu NIK. Tato sekvence kóduje protein NIK s 947 aminokyselinovými zbytky.

- 20 Průzkum dat v databance ukázal, že nová aminokyselinová sekvence proteinu NIK ukazuje zvláště vysokou homologii se skupinou kináz. Většina uvedených kináz slouží jako MAP kináza.

Obr. č. 7 zobrazuje uspořádání:

- 25 myšího MEKKK(S1),

BYR2(S2),

Tp1-2(S3),

onkogen Ewingova sarkomu (S4),

SS3(S5),

- 30 (STE11) (S6),

(NPK1) (S7),

(BCK1) (S8) a

(NIK) (S9).

- 35 Zjistilo se, že některé z těchto kináz mají onkogenní aktivitu, kterou vykazují v případě výskytu v mutované formě.

Příklad 3: Expres klonované cDNA a jejich společná imunoprecipitace s TRAF2.

40

- Buňky HeLa-Bujard se transfekovaly TRAF2 označeným FLAG v expresivním vektoru pUHD10-3. Konstrukce obsahující ORF klonu 9, 10 nebo 15 se fúzovaly s epitopem HA, jak se popisuje v části Materiály a Metody v odst. (iv). Buňky se pak inkubovaly po dobu 24 hodin v Dulbeccově modifikovaném Eagle médiu (DMEM) s 10% telecím sérem, kam se dále přidal <sup>35</sup>S-metionin a <sup>35</sup>S-cystein. Na konci inkubace se buňky lyzovaly v radioimunologickém pufru (10 mM Tris-HCl, pH7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 1 % deoxycholát, 0,1 % SDS a 1 mM EDTA; 1 ml/5x10<sup>5</sup> buněk) a lyzát se přechistil inkubací s irelevantním králičím antisérem a s kuličkami sefaryózy s proteinem G. (Pharmacia, Sweden). Imunoprecipitace proběhla inkubací alikvótů lyzátu s anti-FLAG (získaných od firmy Eastman Kodak CO.) po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C nebo s anti-HA monoklonálními protilátkami (klon 12CA5 (Field, J. et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165)). Exprimované proteiny se analyzovaly na gelu SDS-PAGE a pak následuje autoradiografie.
- 50

Výsledky takových pokusů ukazují, že částečné cDNA klony 9, 10 a 15 kódují proteiny s molekulovou hmotností okolo 50 000 až 65 000, 45 000 a 26 000.

- 5 Zjistilo se, že klon 15 nereaguje s TRAF2, ale proteiny kódované klony 9 a 10 (NIK) stejně jako celý protein NIK imunoprecipitovaly společně s proteinem TRAF2. Vzorky buněk, které se ko-transfekovaly TRAF2 a buď jedním nebo druhým klonem a imunoprecipitovaly se buď s anti-FLAG nebo s anti-HA protilátkami. Pak následuje analýza na SDS-PAGE, jak se popisuje shora v textu, na které se ukázaly v každé dráze tři pruhy: jeden pruh odpovídá proteinům kódovaným  
10 buď klonem 9 nebo 10 a další dva odpovídají zdvojenému proteinu TRAF2 s molekulovou hmotností 42 000 a 44 000.

#### Příklad 4: Funkční testy.

- 15 Na základě retardačního gelového testu se zjistilo, že protein NIK indukuje NF- $\kappa$ B. V typickém případě se 0,5 až 1 x 10<sup>6</sup> buněk 293 EBNA transfekovalo buď 10  $\mu$ g klonu 10 ve vektoru pcDNA (obr. č. 7, dráha 1), 3  $\mu$ g pcDNA3 obsahující cDNA pro receptor p75 TNF (obr. č. 7, dráha 3) nebo klonem 10 (10  $\mu$ g) a receptorem p75 TNF (3  $\mu$ g) (obr. č. 7 dráha 2). Při každé transfekci  
20 množství transfekované DNA se doplnilo prázdným vektorem pcDNA3 na celkové množství 15  $\mu$ g. Jako kontrola slouží buňky 293 EBNA transfekované 15  $\mu$ g samotného vektoru pcDNA3 (obr. č. 7 dráha 4). Buňky se kultivovaly po dobu 24 hodin v médiu DMEM s 10% telecím sérem, pak se shromáždily a dále se ošetřily podle publikace Schreiber, E. Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. (1989), Nuc. Acids Res. 17: 6419. Vzorky se pak nanesly na 5% polyakrylamidový gel. NF- $\kappa$ B se monitoroval za použití sady oligonukleotidů radioaktivně značených  
25 pomocí <sup>32</sup>P, které odpovídají sekvenci vazebnému místu NF- $\kappa$ B a slouží jako sonda. (Sekvence sond jsou GATGCCATTGGGGATTTCCTCTTT a CAGTAAAGAGGAAATCCCCAATGG).

- 30 Jak je uvedeno v tabulce č. IV protein indukuje NF- $\kappa$ B dokonce s větší účinností než TRAF-2. Na druhé straně klon 10 neměl tento účinek.

Test s reportním genem proběhl následovně:

- 35 Buňky 293 EBNA se ko-transfekovaly vektorem pcDNA3, který obsahuje oblast HIV LTR spojenou s luciferázovým reportním genem, spolu s buď plazmidem pcDNA3, jenž obsahuje cDNA samotného receptoru p75, nebo s plazmidem pcDNA3 obsahujícím samotnou cDNA klonu 10 nebo s plazmidem pcDNA3 obsahujícím cDNA receptoru p75 TNF a plazmid pcDNA3 uvedený v tabulce IV a V.

- 40 Výsledky uvedené v tabulce V ukazují:

- a) transfekce klonem 10 neaktivuje indukci NF- $\kappa$ B, zatímco protein NIK silně aktivuje uvedenou indukci,  
45 b) klon 10 stejně jako protein NIK, kde aktivní místo lyzinu se nahradilo alaninem (NIK<sup>\*</sup>), silně inhiboval indukci NF- $\kappa$ B prostřednictvím cDNA uvedené v prvním sloupci v tabulce č. IV.

- 50 Delece 3'UTR proteinu NIK (NIK-3'UTR) značně zesílila jeho expresi a následně jeho schopnost blokovat indukci NF- $\kappa$ B, v případě, že je exprimován v mutované formě.

Tabulka č. IV: Aktivace NF- $\kappa$ B prostřednictvím proteinu NIK. Gelový retardační test. Čísla udávají stupeň radioaktivity, jak se stanovilo „fosfobrazem“ plotny.

| Transfekovaná cDNA | stupeň radioaktivity | plocha (mm <sup>2</sup> ) |
|--------------------|----------------------|---------------------------|
| samotný vektor     | 327                  | 70,7                      |
| TRAF2              | 3411                 | 70,7                      |
| NIK                | 6532                 | 70,7                      |
| klon 10            | 343                  | 70,7                      |

Tabulka č. V: Dominantně negativní účinek klonu 10, NIK K→A, na indukci NF- $\kappa$ B nadměrnou expresí TRAF2, TRADD, MORT1/FADD, TNFR-I, TNFR-II, chiméra TNFR-I/FAS, RIP a aktivace NF- $\kappa$ B pomocí proteinu NIK. Luciferázový test.

| Indukovatel NF- $\kappa$ B | samotný 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      |      |            |               |

#### Příklad 5: Další charakteristiky proteinu NIK.

Vedle testů specifity v příkladu 2 (uvedeno shora v textu) další dvou-hybridní testy vazebných vlastností proteinu NIK ukázaly (výsledky se nepublikují), že z počátku izolovaný částečný klon proteinu NIK (NIK 624-947) se specificky váže na C terminální oblast TRAF2 (doména C-TRAF), zatímco naopak protein NIK v celé délce se váže na doménu C-TRAF a na oblast upstream od ní (doména N-TRAF). Protein se také neváže na TRAF3. Dále chimérická molekula obsahující doménu C-TRAF TRAF2 a N-terminální část TRAF3 by mohla vázat část molekuly NIK (NIK 624-947), ale nikoli protein NIK v plné délce, což ukazuje, že navázání celého proteinu NIK na TRAF2 vyžaduje obě oblasti TRAF2, jak C-TRAF tak i N-TRAF.

Proteiny NIK se vzájemně nespojují, ani se nevážají na intracelulární domény receptorů p55 a p75 TNF; receptor CD40 (člen rodiny receptorů TNF/NGF); a FAS/APO1 (receptor CD95). Protein NIK se také neváže na intracelulární proteiny spojené s těmito receptory, jako jsou například TRADD, MORT1 a RIP. Tyto výsledky korelují s těmi, které jsou zobrazeny v tabulce II (uvedené shora v textu), přičemž se berou do úvahy vazebné specifity proteinů kódovaných klony 9, 10 a 15. Různé interakce mezi různými receptory a proteiny jsou schematicky znázorněny na obr. č. 2a a 2b. Obr. č. 2b je více kompletní.

Northernova blotační analýza ukazuje, že existuje jediný transkript proteinu NIK exprimovaný v různých tkáních v různé síle. Velikost takového transkriptu je okolo 5000 nukleotidů, které jsou v podstatě stejné jako klonované cDNA proteinu NIK (uvedeno shora v textu, obr. č. 6).

- 5 Dále, jak se uvádí shora v textu s ohledem na protein kódovaný klonem 10 (původně označený jako NMPI), celý protein NIK má také motiv serin/threonin proteinové kinázy podobný několika MAP kinázových kináz (MAPKKK), jak také vyplývá ze sekvenčního uspořádání uvedeného na obr. č. 7.
- 10 Testování kinázové aktivity proteinu NIK *in vitro* ukázalo, že protein NIK může být autofosforylován. K autofosforylaci nedojde, když místně aktivní lyzin a vedlejší lyzin jsou nahrazeny alaninem (analog proteinu NIK nebo jeho mutein označený NIK KK429–430AA indukující, že lyziny v pozicích 429 a 430 jsou nahrazeny alaninem). To také odpovídá shora uvedeným výsledkům uvedeným v příkladu 4 a v tabulce č. IV s ohledem na mutein NIK\*.
- 15 Jak se uvádí shora v textu nadměrná exprese proteinu NIK v buňkách 293 EBNA indukuje NF- $\kappa$ B ještě k zesílení nadměrné exprese TRAF2, ale nadměrná exprese částečného proteinu NIK (NIK 624–947) nepřináší aktivaci NF- $\kappa$ B. Navíc shora v textu uvedený analog/mutein proteinu NIK, označený NIK KK429–430AA, také, je-li nadměrně exprimován, neaktivuje NF- $\kappa$ B.
- 20 Pak indukce NF- $\kappa$ B prostřednictvím proteinu NIK závisí na funkci intaktní kinázy NIK. Naopak protein RIP (uvedeno na obr. č. 2a), který také nese kinázovou doménu, může stále indukovat aktivaci NF- $\kappa$ B, v případě, že jeho kinázové aktivity je dosaženo mutací.
- 25 Aktivace NF- $\kappa$ B při nadměrné expresi proteinu NIK nelze rozeznat od aktivace, ke které dochází při ošetření buněk TNF a při nadměrné expresi TNF nebo TRAF2. Základní komponenty NF- $\kappa$ B aktivované proteinem NIK jsou p50 a p65. Nadměrná exprese proteinu NIK způsobuje degradaci I $\kappa$ B $\alpha$  a blokování této degradace N-acetyl-Leu-Leu-norleucinolem (ALLN) vede (stejně jako s TNF) k akumulaci molekul I $\kappa$ B $\alpha$ , které v SDS-PAGE migrují pomaleji, což indikuje fosforylované molekuly I $\kappa$ B $\alpha$ .
- 30 Jiné testy ukázaly, že NF- $\kappa$ B se může aktivovat v buňkách 293 EBNA pomocí TNF stejně jako nadměrnou expresí receptoru p55 a p75 nebo nadměrnou expresí receptoru p55 TNF, kde intracelulární doména receptoru p55 TNF je nahrazena doménou receptoru FAS/APO1. NF- $\kappa$ B se také může aktivovat nadměrnou expresí TRAF2, TRADD, RIP nebo MORT1, ale ne delecí
- 35 MORT1 v mutantu, kterému chybí oblast upstream mrtvé domény MORT1. Jak se uvádí shora v textu, celý NIK, ale nikoli mutein proteinu NIK označený NIK KK429–430AA ani částečný NIK (NIK 624 až 947), indukuje aktivaci NF- $\kappa$ B. Avšak exprese muteinu NIK KK429–430AA nebo NIK 624–947 v buňkách 293-EBNA spolu s libovolným jiným shora uvedeným činidlem, to jsou např. receptory nebo asociované proteiny, vede ke zablokování indukce aktivace NF- $\kappa$ B
- 40 všemi jinými činidly, což indikuje, že aktivita proteinu NIK se podílí na indukci NF- $\kappa$ B. Podobně shora uvedená inhibice aktivními molekulami NIK koreluje se sníženou redukcí I $\kappa$ B $\alpha$ .
- 45 NF- $\kappa$ B se také aktivuje pomocí IL-1 (schéma je zobrazeno na obr. č. 2b). Tento účinek je zjevně závislý na TRAF2 (IL-1 se neváže na TRAF2 a účinek IL-1 není blokován expresí dominantně negativního mutantu TRAF2). Účinek IL-1 se inhibuje expresí mutantů proteinu NIK. Navíc aktivita NF- $\kappa$ B pozorovaná při nadměrné expresi homologu p65 Rel v buňkách 293 EBNA není způsobena ko-expresí kináza-deficitních mutantů proteinu NIK, což indikuje, že protein NIK neovlivňuje přímo funkci proteinů Rel, ale podílí se na jejich aktivaci indukovaným receptorem.
- 50 Cytotoxická aktivita TNF (jasně zprostředkovaná MORT1-asociovanou proteázou MACH, obr. č. 2b) podléhá negativní regulaci některých NF- $\kappa$ B indukovatelných genů. Antagonizující okolnosti indukce genů zprostředkované NF- $\kappa$ B a aktivace MACH mohou vysvětlit, proč samotný TNF stejně jako IL-1 může indukovat buněčnou rezistenci k TNF cytotoxicitě. V souladu s tím se také zjistilo, že exprese dominantních negativních mutantů v buňkách 293 EBNA podle
- 55 vynálezu podstatně zesiluje jejich citlivost k odumírání na základě působení TNF a že nadměrná

exprese nativního (celého, divoký typ) proteinu NIK inhibuje odumírání buněk na základě působení TNF nebo nadměrné exprese receptoru p55 TNF (tento receptor má intracelulární doménu, která zahrnuje tzv. oblast mrtvé domény, jež exprimuje-li se v buňkách bez přítomnosti libovolného TNF, může indukovat svou vlastní buněčnou cytotoxicitu).

5

Příklad 6: Další funkční testy v případě biologické aktivity proteinu NIK.

10 V souladu s vynálezem se také zjistilo, že exprese dominantních negativních mutantů by mohla také blokovat indukcí aktivace  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  v buňkách 293 EBNA pomocí dalších indukčních činidel, které zahrnují: (i) dobře známý bakteriální endotoxin, lipopolysacharid (LPS); (ii) dobře známý forbolmyristátacetát, který je znám jako aktivátor proteinové kinázy C a (iii) HTLV-1 protein TAX.

15 Dále se zjistilo, že exprese dominantních negativních mutantů proteinu NIK v buňkách 293-EBNA nemá v podstatě žádný účinek na aktivitu Jun kinázy indukovanou TNF, která indikuje, že protein NIK specificky a přímo zvyšuje fosforylaci  $\text{I}\kappa\text{B}$ , aniž se MAP kinázy podílí na fosforylaci Jun.

20 Z uvedeného vyplývá, že kinázová aktivita proteinu NIK je část signální kaskády, která je odpovědná za aktivaci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  a je běžná u receptorů TNF, receptoru FAS/APO1 a receptoru IL-1. Protein NIK se účastní této kaskády. Navázání proteinů NIK na TRAF2 může umožnit, aby protein NIK byl ovlivněn receptory TNF a receptorem FAS/APO1. Prostřednictvím analogu k MAP kinázovým kaskádám může NIK sloužit jako substrát pro kinázu (MAPKKKK). Tento  
25 substrát požaduje TRAF2, aby stimuloval receptory tak, že když protein NIK je fosforylován, fosforyluje a aktivuje jiné kinázy (nebo může indukovat přímo aktivaci  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  přímou fosforylací  $\text{I}\kappa\text{B}$ ). Aktivace  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  indukovaná IL-1 je nezávislá na TRAF2 a proto aktivace receptorem IL-1 se může zprostředkovat dalším proteinem IRAK, serin/threonin kinázou, kterou posiluje po stimulaci receptor IL-1 (Cao, Z. et al., (1996b) Science 271, 1128-1131), a také pomocí TRAF6,  
30 který se váže na IRAK (Cao, Z., et al., (1996a) Nature 383, 443-446), schéma na obr. č. 2b). Jak se uvádí shora v textu, cílem proteinu NIK nebo kinázové kaskády, kterou aktivuje, je pravděpodobně  $\text{I}\kappa\text{B}$ . Protein NIK může také fosforylovat proteiny TRAF nebo regulační proteiny, které se na ně váží, například TANK-1/TRAF (Cheng, G. and Baltimore, D. (1996) Genes Dev. 10, 963-973; Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995a) Science 269, 1424-  
35 1427) za vzniku míst pro jiné proteiny.

40

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaný polypeptid, který se váže na faktor 2, asociovaný s receptorem TNF (TRAF2) a moduluje aktivitu nukleárního faktoru  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), polypeptid je tvořen
  - a) sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:3 sekvencí aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID No:6, nebo sekvencí aminokyselin SEQ ID No:7,
  - b) sekvencí aminokyselin, která je fragmentem a) který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$ ,
  - c) sekvencí aminokyselin, která je analogem a) nebo b), obsahuje méně než deset změn v sekvenci aminokyselin a) nebo b) a která se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$ ,
  - d) derivátem a), b) nebo c), který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$ .
2. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kterým je polypeptid a) se sekvencí, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3.
3. Izolovaný polypeptid podle nároku 1, kterým je polypeptid a) se sekvencí SEQ ID NO:7 a s vlastností kinázy, indukující NF- $\kappa B$  (NIK).
4. Izolovaný polypeptid NIK podle nároku 3, který obsahuje alespoň část sekvence aminokyselin SEQ ID NO:7.
5. Izolovaná sekvence DNA, kódující polypeptid, který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$ , zvolená ze skupiny
  - i) cDNA, tvořená nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:6,
  - ii) cDNA, tvořená nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3,
  - iii) fragment sekvence i) nebo ii), kódující polypeptid, který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$  nebo
  - iv) sekvence DNA, schopná hybridizace se sekvencí i) až iii) za mírně omezujících podmínek a kódující polypeptid, který se váže na TRAF2 a moduluje aktivitu NF- $\kappa B$ .
6. Izolovaná sekvence DNA podle nároku 5, kterou je nukleotidová sekvence SEQ ID NO:3.
7. Izolovaná sekvence DNA podle nároku 5, kterou je DNA sekvence kódující protein NIK se sekvencí SEQ ID NO:7.
8. Vektor, který obsahuje sekvenci DNA podle některého z nároků 6 a 7.
9. Vektor podle nároku 8, který je schopný se exprimovat v eukaryontních hostitelských buňkách.
10. Vektor podle nároku 8, který je schopný se exprimovat v prokaryontních hostitelských buňkách.
11. Transformované eukaryontní nebo prokaryontní buňky, které obsahují vektor podle nároku 8.

12. Způsob produkce izolovaného polypeptidu, který se váže na TRAF a moduluje aktivitu NF- $\kappa$ B, **vyznačující se tím**, že se polypeptid exprimuje v transformovaných hostitelských buňkách podle nároku 9 za podmínek, vhodných pro expresi tohoto proteinu, jeho izoformy, fragmentu, analogu nebo derivátu, a dále se v případě potřeby uskuteční posttranslační modifikace za vzniku uvedeného proteinu, jeho izoformy, fragmentu, analogu nebo derivátu a exprimovaný protein, jeho izoforma, fragment, analog nebo derivát se izoluje.
13. Protilátky nebo jejich aktivní fragmenty nebo deriváty, specifické pro polypeptid podle některého z nároků 1 až 4.
14. Způsob izolace a identifikace polypeptidu podle některého z nároků 1 až 4, schopného se vázat na TRAF2 a modulovat aktivitu NF- $\kappa$ B, **vyznačující se tím**, že se aplikuje kvasinkový dvouhybridní postup, při němž je sekvence, kódující TRAF2 nesena jedním hybridním vektorem a sekvence z knihovny cDNA nebo z knihovny genomové DNA je nesena druhým hybridním vektorem, přičemž tyto vektory se pak užijí k transformaci kvasinkových hostitelských buněk, pozitivní transformované buňky se izolují a pak se extrahuje uvedený sekundární hybridní vektor, kódující polypeptid, který se váže na TRAF2.
15. Farmaceutická kompozice pro modulaci účinku na buňky, modulovaného/zprostředkovaného TRAF2, **vyznačující se tím**, že jako aktivní látku obsahuje polypeptid podle některého z nároků 1 až 4.
16. Farmaceutická kompozice pro modulaci účinku na buňky, modulovaného/zprostředkovaného TRAF2, **vyznačující se tím**, že jako aktivní látku obsahuje rekombinantní zvířecí virový vektor, kódující protein, schopný se vázat na buněčný povrchový receptor a dále kódující alespoň jeden polypeptid podle některého z nároků 1 až 4.
17. Farmaceutická kompozice pro modulaci účinku na buňky, modulovaného/zprostředkovaného TRAF2, **vyznačující se tím**, že jako aktivní látku obsahuje oligonukleotidovou sekvenci, kódující anti-sense sekvenci sekvence mRNA, kódující polypeptid podle některého z nároků 1 až 4.
18. Farmaceutická kompozice pro prevenci nebo léčení patologického stavu, spojeného s indukcí NF- $\kappa$ B, na který se váže polypeptid podle některého z nároků 1 až 4, ze skupiny nádorová onemocnění, akutní hepatitis, autoimunitně indukované uhynutí buněk, odmítnutí štěpu a další choroby, vyžadující imunostimulační účinek, roztroušená skleróza a AIDS, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství proteinu, kódovaného nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3 nebo molekulu DNA, kódující tento protein.
19. Farmaceutická kompozice pro prevenci nebo léčení patologického stavu, asociovaného s indukcí NF- $\kappa$ B, na který se váže polypeptid podle některého z nároků 1 až 4, ze skupiny nádorová onemocnění, akutní hepatitis, autoimunitně indukované uhynutí buněk, odmítnutí štěpu a další choroby, vyžadující imunostimulační účinek, roztroušená skleróza a AIDS, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství proteinu NIK, nebo molekulu DNA, kódující tyto látky.
20. Farmaceutická kompozice pro prevenci nebo léčení patologického stavu, asociovaného s indukcí NF- $\kappa$ B, na který se váže protein, kódovaný nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3 podle nároku 2, ze skupiny nádorová onemocnění, akutní hepatitis, autoimunitně indukované uhynutí buněk, odmítnutí štěpu a další choroby, vyžadující imunostimulační účinek, roztroušená skleróza a AIDS, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství proteinu, kódovaného nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3 nebo molekulu DNA, kódující tento protein.

21. Farmaceutická kompozice pro prevenci nebo léčení patologického stavu, asociovaného s indukcí NF- $\kappa$ B, na který se váže protein NIK, jeho izoforma, fragment, analog nebo derivát podle nároku 3, ze skupiny nádorová onemocnění, akutní hepatitis, autoimunitně indukované uhynutí buněk, odmítnutí štěpu a další choroby, vyžadující imunostimulační účinek, roztroušená skleróza a AIDS, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje účinné množství proteinu NIK nebo molekulu DNA, kódující tyto látky.

22. Způsob testování ligandu, schopného se vázat na polypeptid podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se matrice afinitní chromatografie, na níž je uvedený polypeptid zachycen uvede do styku s buněčným extraktem, přičemž se ligand naváže na uvedenou matici, načež se uskuteční eluce, izolace a analýza uvedeného ligandu.

23. Způsob přípravy ligandu, schopného se vázat na polypeptid podle některého z nároků 1 až 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se aplikuje kvasinkový dvouhybridní postup, při němž je sekvence, kódující polypeptid nesena jedním hybridním vektorem a sekvence z knihovny cDNA nebo z knihovny genomové DNA je nesena druhým hybridním vektorem, přičemž tyto vektory se pak užijí k transformaci kvasinkových hostitelských buněk, pozitivní transformované buňky se izolují a pak se extrahuje uvedený sekundární hybridní vektor za vzniku kódové sekvence pro uvedený ligand.

24. Způsob identifikace a produkce ligandu, schopného modulovat buněčnou aktivitu, modulovanou nebo zprostředkovanou polypeptidem podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že

- a) vyhledá ligand, schopný se vázat na polypeptid, obsahující sekvenci NIK, SEQ ID NO:7,
- b) identifikuje a charakterizuje se ligand, odlišný od TRAF2 nebo částí receptoru receptorové rodiny TNF/GNF, nalezený krokem vyhledávání tak, aby byl schopen uvedené vazby a
- c) ligand se produkuje ve v podstatě izolované a čištěné formě.

25. Způsob identifikace a produkce ligandu, schopného modulovat buněčnou aktivitu, modulovanou nebo zprostředkovanou NIK, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se

- a) vyhledá ligand, schopný se vázat na sekvenci NIK, SEQ ID NO:7,
- b) identifikuje a charakterizuje se ligand, odlišný od TRAF2 nebo částí receptoru receptorové rodiny TNF/GNF, nalezený krokem vyhledávání tak, aby byl schopen uvedené vazby a
- c) ligand se produkuje ve v podstatě izolované a čištěné formě.

26. Anti-sense oligonukleotid, tvořený sekvencí, komplementární k alespoň fragmentu kódové mRNA pro polypeptid, který se váže na TRAF2 a obsahuje sekvenci aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:3, sekvenci aminokyselin, kódovanou nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO:6 nebo sekvencí aminokyselin SEQ ID NO:7, přičemž anti-sense oligonukleotid je schopen účinně blokovat translaci svrchu uvedené mRNA.

27. Použití polypeptidu podle některého z nároků 1 až 4 pro výrobu farmaceutické kompozice pro podání nemocným, kteří trpí patologickým stavem, asociovaným s indukcí NF- $\kappa$ B, zprostředkovanou TRAF2, na které se váže polypeptid podle některého z nároků 1 až 4.

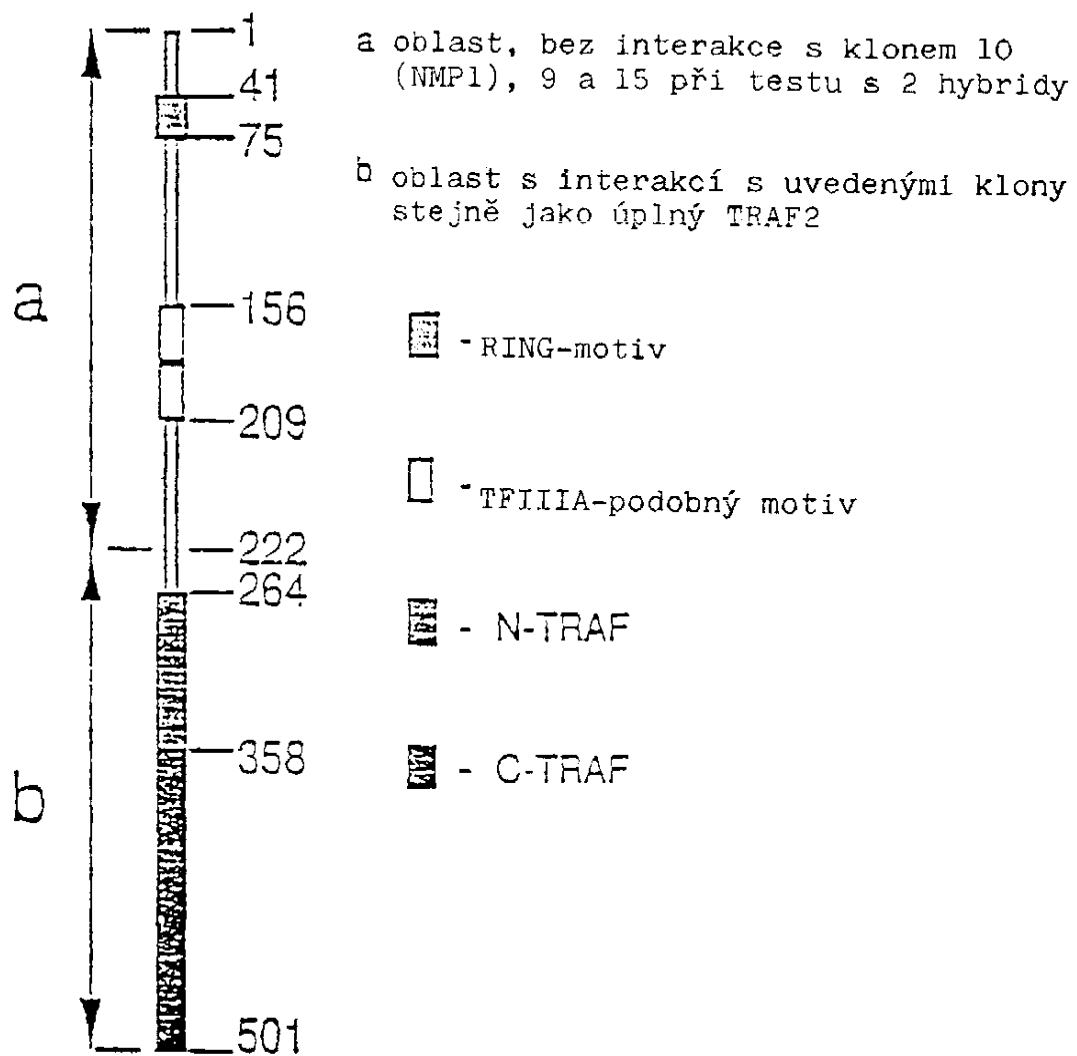


FIG. 1

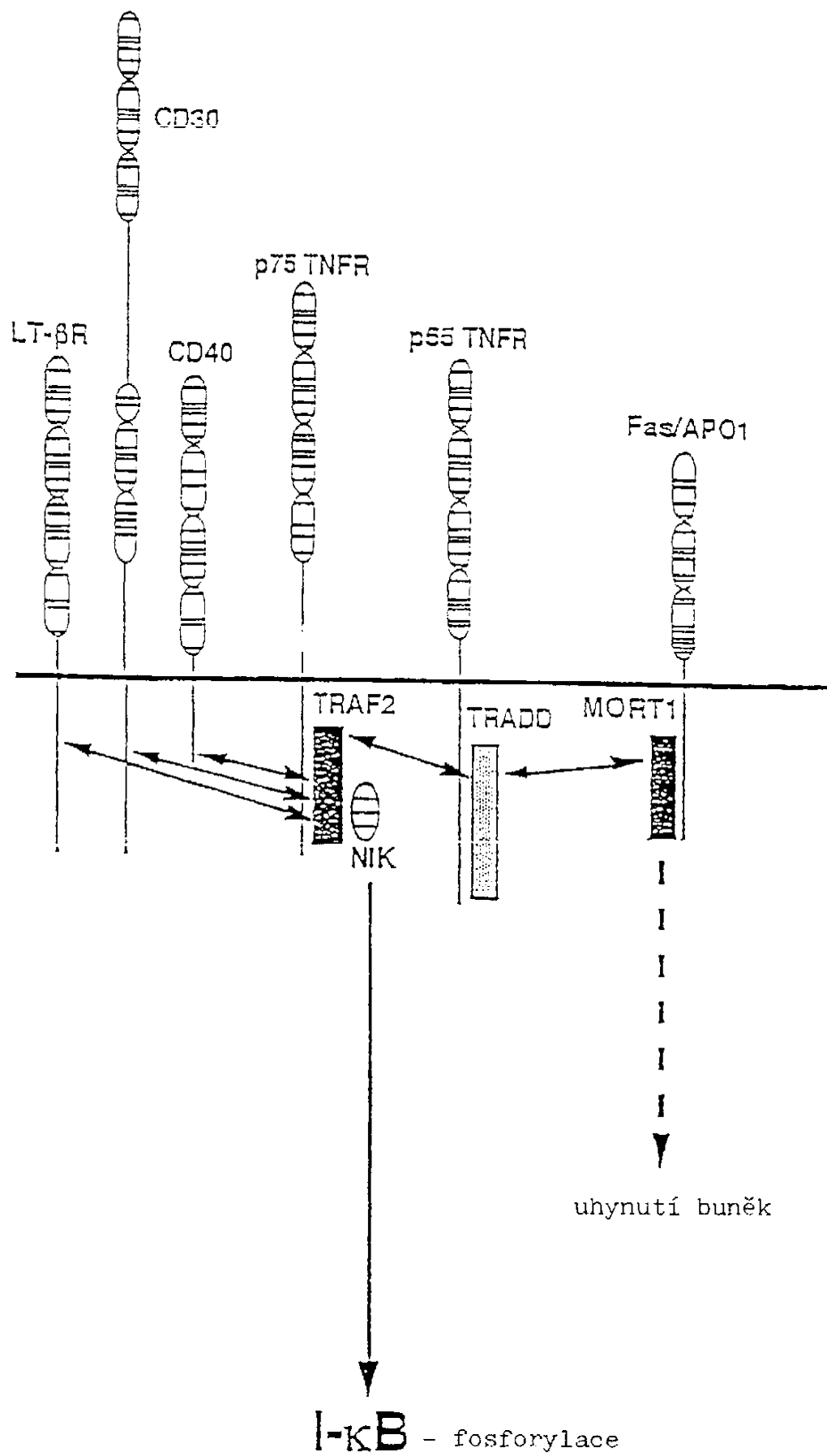


FIG. 2A

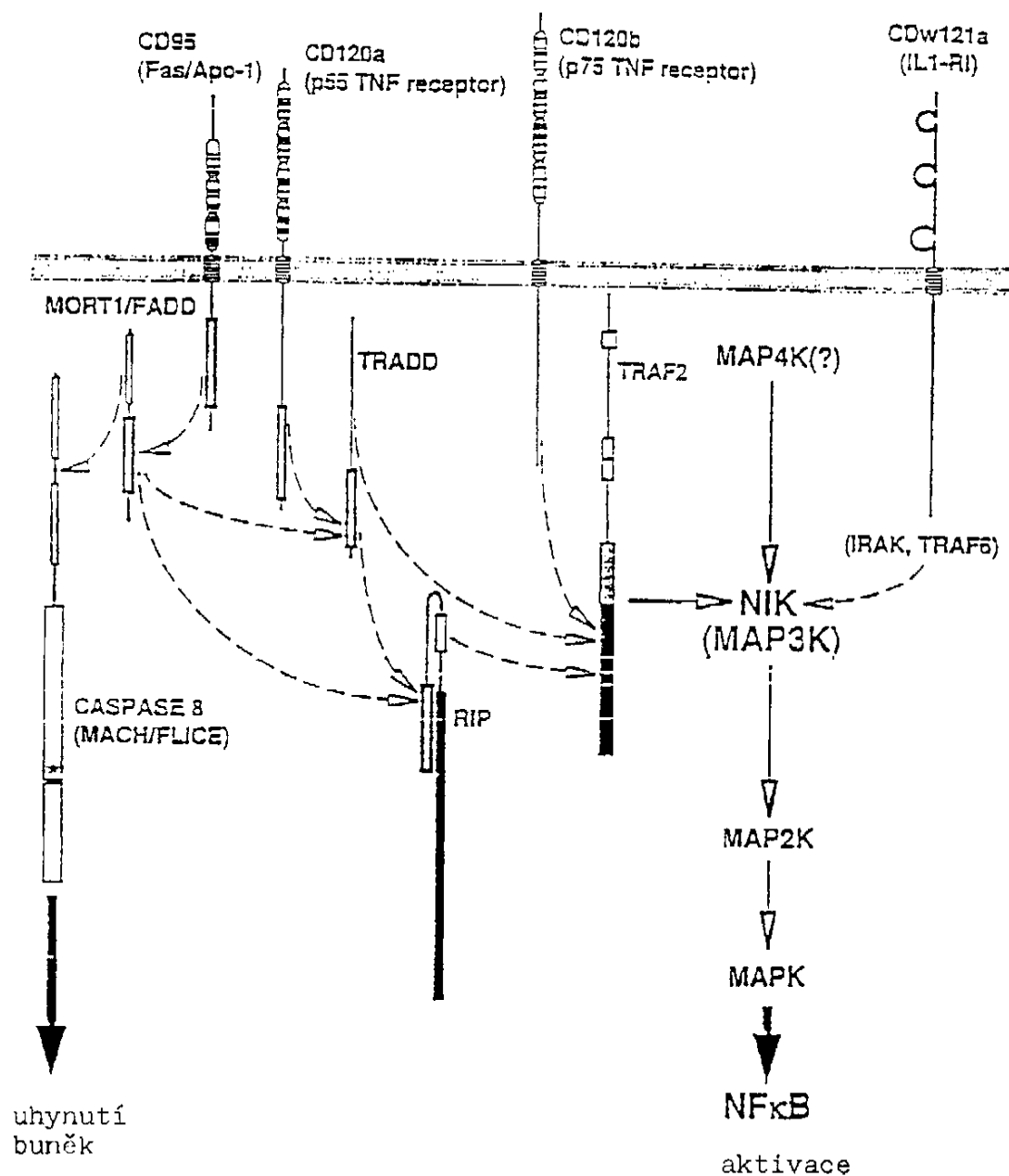


FIG. 2B

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

```

1  CATTGGGTCA CGCGGTGGCG GCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCgggCTG
51  CAGGAATTGG ATTGGAGGCC ACGAAGGCCG GCGGCGCGGC GCAnGCACCG
101 GCGCGGGGAn AGGCnCCATG AGCGGATCnC nGAACnATGA CAAAAGACAA
151 TTTCTGCTGG AGCGACTGCT GGATGCAGTG AAACAGTGCC AGATCCGCTG
201 TnGAGGGAGA AAGGAGATTG CCTCGGATTC CGACAGCAGG GTCACCTGTC
251 TGTGTGCCCCA GTTTGAAGCC GTCCTGCAGC ATGGCTTGAA GAGGAGTCGA
301 GGATTGGCAC TCACAGCGGC AGCGATCAAG CAGGCAGCGG GCTTTGCCAG
351 CAAAACCGAA ACAGAGCCCCG TGTTCCTGGTA CTACGTGAAG GAGGTCCTCA
401 ACAAGCACGA GCTGCAGCGC TTCTACTCCC TCGGCCACAT CGCCTCAGAC
451 gTGGGCGCGGG GTCGCGCGCTG GCTGnGCTGT GCCCTCAACG AACACTCCCT
501 GGAGCGCTAC CTGCACnTGC TCCTGGCCGA CCGCTGCAGG CTGAGCnCTT
551 TTTATGAAGA CTGGTCnTTTT GTGATGGnTG AAGAAAGGTC CAGTATGCTT
601 CCTACCATGG CAGCAGGTCT GAACTCCATA CTCnTTTGCGA TTAACATCGA
651 CAACnAGGAT TTGAACGGGC AGAGTAAGTT TGCTCCCACC GTTTCAGACC
701 TCTTAAAGGA GTCAACGCAG AACGTGACCT CCTTGCTGAA GGAGTCCACG
751 CAAGGAGnGA GCAGCCTGTT CAGGGAGATC ACAGCCTnCT nTGCCGTnTC
801 CATCnTCATC AAACCTGAAC AGGAGACCGA CCCTTGCCCTG TCnTGnCCAG
851 GAATGTCAGT GCTGATGCCA AATGCCAAAAA GGAGCGGAAG AAGAAAAAGA

```

FIG. 3A

901 AAGTGACCAA CATAATCTCA TTTGATGATG AGGAAGATGA GCAGAACTCT  
951 GGGGACGTGT TTAAAAAGAC ACCTGGGGCA GGGGAGAGCT CAGAGGACAA  
1001 CTCGGACCGC TCCTCTGTCA ATATCATGTC CGCCTTTGAA AGCCCTTCG  
1051 GGCCTAACTC CAATGGAATC AGAGCAGCAA CTCATGGAAA ATTGATTCCC  
1101 TGTCTTTGAA CGGGGAGTTT GGGTACCAGA AGCTTGATGT GAAAAGCATC  
1151 GATGATGAAG ATgTGGATGA AAACGAAGAT GACgTGTATG GAAACTCATC  
1201 AGGAACGAAG CACAGGGGCC ACTCGGAGTC GCCCGAGAAG CCACTGGAAG  
1251 GGAACACCTg CCTCTCCcAG ATGCACAGCT GGgCtCCGCT GAAGgTgCTG  
1301 CaCaATGACT CCGACATCCT CTTCCCTGTC AGTGGCGTGG gCTCCTACAG  
1351 CCCAGCAGAT gCCCCCCTCG GAAGCCTGGA GAACGGGACA GGACCAGAGG  
1401 ACCACGTTCT CCCGGATCCT GGACTTCGGT ACAGTGTGGA AGCCAGCTCT

FIG. 3B

1451 CCAGGCCACG GAAGTCCTCT GAGCAGCCTG TTACTTCTGC CTCAGTGCCA  
1501 GAGTCCATGA CAATTAGTGA ACTGGGCCAG GCCACTGTGG CCATGATGAA  
1551 CAGGAAGGAT GAGCTGGAGG AGGAGAACAG ATCACTGCCA 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

FIG. 3C

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  XTGPGXGXMS GSXNXDKKQF LLEZLLDAVK QQQRFYKGRK EIASDSDSRV
51  TCLCAQFEAV LQGLKRSRG LALTAAAIKQ AAGFASNTET EPVFWYTVRE
101 VLNKHELQRF YSLRWIASDV GGRRAWLRCA LNEHSLERYL EMILLADRCL
151 STFYEDWSFV MDEERSSMLP TMAAGLNSIL FAINIDNDEL NGQSKFAPTV
201 SDLLKESTQN VTSLLKESTQ GVSSDLFEIT ASSAVSELIX PEQETDFCLS
251 CPGMSVLMEN AKRSGHKKK *ST*SHLMMR KASRTLGTCI KRHLGQGRAQ
301 RTTPTAPLSI SCPPLKAPSG LTPMESEQQL MEN*FFVFER GVWVFEA*CE
351 KHR**RCG*K RR*RVWLLR KEAQGPGLVA REATGEHLP LPDAQLGSAE
401 GAAQ*LRHPL PCQWRGLLQP SRCPPRKEGE RDRTRGPRSP GSWTSVQCGS
451 QLSRPRKSSE QPVTSASVE SMTISELRQA TVAMGNKDE LEEENRSLRN
501 LLDGEMESA ALRQEVDTLK RAVAEQEERQ GMEVQALASY LCYFVRRF*P
551 HVRTMWRNG GREKSNSS** SHLSSWIQSF LKLCPLWTFE VCEPINCFS
601 LKKK

```

FIG. 3D

clone 10 Length: 2631 August 23, 1996 17:18 Type: N Check: 5107

```

1  CCCCtTcTcAC AGCcCAGGCC ATCCACAGAGG GqCTGAGGAA AGAGCCCCATC
51  cACCGcGTGT cTGCAGcCGA GcTGGGAGGG AAGGTGAACC GGGCAcTACA
101 GCAAGTGGGA GGTcTGAAGA GcCCTTGGAG GGGAGATAT AAAGAACCAG
151 GAGATCCACc GCCAAATCAA GcCbaAtTACC ACCAGACCcT CcATGCCcAg
201 CCGAGAGAGc TtTcGCCAAG GcCCCCAGGG CCCCCGCCAg CTGAGGAGAG
251 AACAggCAGA GcCCcTAAGc TCCAGCcTCC TcTCCCACCA GAGCCCCCAG
301 AGCCaAACAA GTcTCTCTCC tTGACTtTGA GCAAGGAGGA GTcTGGGATG
351 TGGGAACCCCT TACcTcTcTc cTCCCTGGAG CCAGCTCCCTG CCAGAAACCC
401 CAGcTCACCA GAGCGGAAAG CAACCGTCCC GGAGCAGGAA CTGCAGCAGC
451 TCGAAATAGA ATTATTCTCT AACAGCCTGT CCCAGcCATT TcTcTGGAG
501 GAGCAGGAGC AAATTCTcTc GTGCCTCAGC ATCGACAGCC TCTCCCTCTC
551 GGATGACAGT GAGAAGAACC CATCAAGGC CTCTCAAGC TCGCGGGACA
601 CCCTGAGCTC AGGCGTACAC TCCTGGAGCA GcCAGGCCCA GGcTCCAAGc
651 TCCAGCTGGA ACATGCTGcT GcCCCCGGGg CGcCSCACCG ACAGCCCCAG
701 CTATTTCAT GGTGTGAAAG TCCAAATACA GTCTCTTAAT GGTGAACACC
751 TGCACATCCG GGAGTTCCAC CCGGTCAAAG TGGGAGACAT CCCCACCTGC
801 ATCAGCAGCC AGATCCCAGC TCCAGCCTTC AGCTTGCTCA CCAAGACCG
851 GCAGCCTGTT CCTACGACA TGGAGGTGCC AGACTCGGCC ATCGACCTGC
901 AGTGCACTACT GcCCCCCTGAT GGCAGCTTCG CCTGGAGCTG GAGGCTCAAG
951 CATGCCcAGC TGGAGAACAG GcCCTAACCC TGCCCTCCAC CCCCCGcTCC
1001 ACACTGCCCG aAAGCAGCCT TCCTGCTCGG tGCACCATGC TCCCCTGaAA
1051 AcACAGGcTC AGCcGTTCCC AgGGgATyTG .CCAGcCCCC cGGcTcArCA
1101 G.tGGGAAcC AGGGcCTcG. CAGC.AGC.A AGGT.gGGGG CAAGC.AGAA
1151 TGCCtCCCCAG GATTTcACA. CcTGAGCCC. TGCCCCA.CC cTGcTcaadA
1201 AAAcAyT.CC GGCACGtGAA GAgACAGaAG GAGGATGG.C AGGAgTt..A
1251 CcTygGGGAA aCaAAAcAGg gaTcTTt.tT cTGCCCCcTGC TCCAGT.cGA

```

FIG. 4A

1301 gttGGCCTG. ACCCGcTTGG A.TCagtGAC CATTtGtTGG CAGA.CAGGG  
 1351 GagAgCAGcT TCCAGCcTGG gTCAGAAGGG GTGGGcGAGC CcTtGGGCCC  
 1401 cTcAcCCT.c cAGGcTGcTG EG.AGAGTGT GAACTcTGTa AGGG.CCCAA  
 1451 A.cTcAGG.T TCAGTGCAGA ACCAgGT.CA GCAGGTATGC CCGCCCC.TA  
 1501 GGTtAA..GG GGGCCcTcT. AAACCCcTTG cCT.GGGCT. CAcCT.GGCC  
 1551 AGCTCA.CCC cTTTTGGGTG TAGGGGAAAA GAATGCCTGA CCCTGGGAAG  
 1601 GCTWCCCTGG TAGAATACAC CACACTTTTC AGGTtGTtGC AACACAGGTC  
 1651 CTGAGTTGAC CTCTGTTCA GCCAAGGACC AAAGAAGGTG TGTAAAGTGA  
 1701 GTGGTTCTCA gT.CCCCAgA CATgTgCCCC TTTGCTGCTG GCTACCACTC  
 1751 TTCCCCAgAg CAGCAGGcCC CgAgCCCCCTT CAGGcCCAgC AcTScCCCCAG  
 1801 AcTCgCTGGC aCTCAGTTCC CTCATCTGTa AAGGTCAAGG GTcATGCAGG  
  
 1851 ATATGCCTGA CAGGAACAGT CTCTGGAtGG AcATGATCAg TcCT.AAGG.  
 1901 AAAGCAGcAG AGaGAGAGSy TCcGGCCCC CAg.CCCCC T.ATCAGTgT  
 1951 .CCAgCGTGC T.GGTT.CCC CAg.AGCACA GcT.CAg.CA TcA.CACTGA  
 2001 CACT.CAcCC T.GCCcTGCC cCT.GGCCA. GAgGGTACTG CCG.ACGGCA  
 2051 CTTTGCAc.T CTGATG.ACC TCAAAGCACT TTCATGgCT. GcCCTcT..G  
 2101 GCAGGG.CAG GG.CAGGG.C AgTGAcA.CT GTAgG.AGCA TA.gCAA.GC  
 2151 CAgGAGATGG GGTG.AAGGG A.CACAGTCT TGAGCTGTCC A.CATCCATG  
 2201 TGAcT.CCTC AAACCTcTT. .CCAG.ATTT CTCTAAGAAT AGCA.CCCCC  
 2251 TT.CCCCATT GCCCCAGCTT AgCCTCTTCT CCCAGGGGAG CTA.CTCAgG  
 2301 ACTCACGTAg CATTAAATCA GCTGTG.AAT CcTCAGGGGG TGTCTGCTAg  
 2351 CCTCAACCTC CTGGGGCaGG GGACgCCGAg ACTCCGTGGG AgAAgCTCAT  
 2401 TCcCaCATCT TGCCAAgACA gCCTTT.GTC CAgCTGTCCA CATTGAgtCA  
 2451 gACTGCTCCC GGGGAgAgAg cCCCGGcCCC CAgCACATAA AGAACTGCAG  
 2501 CCTTGCTACT GCAGAGTCTG GGTtGTAGAG AACTCTTTGT AAGCAATAAA  
 2551 GTTTGGGGTG ATGACAAATG TTAaaaaaAG GCCTTCGTGG CCTCGAATCA  
 2601 AGCTTATCGA TACCCTCGAC CTCGAGGGGG G

FIG. 4B

Length: 1253 July 10, 1996 clone15

```

1  CATTGGAGTC ACGCGGTGGC GGGGCTCTAG AATAGTGGAT CCGCGGGCTg
51  CA.GGAATTC GATTGAGCC CACGAAGGCC CATTCTTCTG TGGTCGCGGC
101 ACGTTTACg CCGCAGCAc CCAGCGGCAg CTGAAGGAGG CTTTIGAgAG
151 GCTCCTgCCC CAGGTGGAGG CGGCCCCGAA GGCCTCCgC GCGGCTCAGg
201 TGGAGCGCTA TGTGCCCGAA CACGAGCGAT GCTGCTGGTG CCTGTGCTGC
251 GGCTGTGAGG TCGCGGAACA CCTGAGCCAT GGAACCTGA CGGTGCTGTA
301 CGGGGGgCTG CTGGAGCATC TGGCCAGCCC AGAGCACAAG AAAGCAACCA
351 ACAAATTCTG GTGGGAGAAC AAAGCTGAGG TCCAGATGAA AGAGAAGTTT
401 CTGGTCACTC CCCAGGATTA TGCCCGATTc AAGAAATCCA TGGTGAAAGG
451 TTTGGATTCC TATGAAGAA AGGAGGATAA AGTGAACAG GAGATGgCAG
501 CTCAGATCCG TGaGGTGGAg CAGAgCCGAC AGGAGgTGGc TCGGcCTGTc
551 TTAGAgCctC AGGCAGTGcc AGACCCAGAA GAGGGcTCTT CAGCACCtAG
601 AAGCTGGAA GGGATGAACA GCCAAGTAGc TTCCAGCTTA CAGcAGcCCT
651 CAAATTTGGA COTGCCACCA GCTCCAGAGC TTGACTGGAT GAGGACAGGA
701 CCATCTCTGA CATTCAITGG CCATCAGGAT ATACCAGGAG TTGGTAACAT
751 CCACTCAGGT GCCACACCTC CCTGGATGAT CCAAGATGAA GAATACATTG
801 CTGGGAACCA AGAAATAGGA CCATCCTATG AAGAAATTCT TAAAGAAAAG
851 GAAAAACAGA AGTTGAAAAA ACTcCCCCCA GACCGAGTTG GGGCCAACtT
901 TGATCACAGC TCCAGGACCA GTGCAGGCTG GCTGCCCTCT TTTgGGcCGC
951 GTCTGGAATA ATGGACGCCG CTGSCAGTCC AGACATCAAC TcCAAAACTG
1001 AAGCTGCAGC AATGAAGAAG CAGTCACATA CAGAAAAAAG CTAATCATGC
1051 TCTCTACCAA CTACCATGAG GCTAAAAGCC AAAGTCAACC AAACCCCTAT
1101 TATACCTTCC ACCCAAATTC TTTATCATTG TCTTTCTTAG GAAACAGACA
1151 TACTCATTCA TTTGATTAA TAAAGTTTAA TTTTTCGGCC TTCGTGGCCT
1201 CGAATCAAGC TTATCGATAC CGcCGACCTC GAGGGGGGGC CGTACCCACT
1251 TTT

```

FIG. 5A

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 IVDPRAAXNS IRAHEG7FFC GRGTFTAAST QRQLKEAFER  
51 LLPQVEAARK AIRAAQVERY VPEHERCCNC LCCGCEVREH LSHGNLTVLY  
101 GGLLEHLASP EHKKATNKFW WENKAQVQMK EKFLVTPQDY ARFKKSMVKG  
151 LDSYEEKEDK VIKEMAAQIR EVEQSRQEVV RSVLEPQAVP DPEEGSSAPR  
201 SWKGMNSQVA SSLQQPSNLD LPPAPELDWM ETGPSLTFFG HQDIFGVGNI  
251 HSGATTFWMI QDEEYIAGNQ EIGPSYEEFL KEKEKQKLLK LPPDRVGANF  
301 DHSSRTSAGW LPSTGPRLE\* WTPLAVQTST PKLKLQQ\*RS SHIQKKAHA  
351 LYQLP\*G\*KP KSTK2LLYLP PKFFIIVFLR KQTYSFI\*FN KVLFFGLRGL  
401 ESSLSIFSTS RGGRTHF

FIG. 5B

1 AGC GGG GGG ACT GTG CCG TGT GGA ACG TGT AGC TGT TGA AGG TGG ACT CTG TTA CCA TTG  
 31  
 61 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 CAA 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 GCT 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  
 G S K Q Y S S Q Q S E S L D Q I P N N V A H

FIG. 6A

601 GCT 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 AGC TCA AAG TCC CTG GCT CAT GCA GGA GTG GCC TTG GCC AAA  
 K R 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 CCT 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 CCG 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 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 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 B S S Q A H S L T S L A K T W A A R

FIG. 6B

1321 GGC TCC AGA TCC CGG GAG CCC AGC CCC AAA ACT GAG GAC AAC GAG GGT GTC 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 W A T H Q  
 1441 CTC CGC CTG GGC AGA GGC TCC TTC GGA GAG GTG 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 GTG GGC CTC GAA GTA TTT OGG 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 GTG 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 I 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 CAT GGG GAC GTC AAA GCT GAC AAC GTG CTC CTG  
 E Y L H 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 M  
 1921 GCT CCG GAG GTG GTG CTG GGC AGG AGC TGC 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

FIG. 8C

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 M L N G C H P 2011  
 2041 CTC TGC CTC AAG ATT GCC AGC GAG CCG CCG GTG AGG GAG ATC CCA CCC TCC TGC GCC  
 L C L K I A S E P P P V 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  
 2161 GCA GCG GAG CTG GGA GGG AAG GTG AAC CCG GCA CTA CAG CAA GTG GGA GGT CTG AAG AGC  
 A A E L G G K V N R A L Q Q V G G L K S  
 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  
 2281 CAG ACC CTC CAT GCC CAG CCG AGA GAG CTT TCG CCA AGG GCC CCA GGG CCC CGG CCA GGT  
 Q T L H A Q P R E L S P R A P G P R P A  
 2341 GAG GAG ACA ACA GGC AGA GCC CCT AAG CTC CAG CCG CCG CCG 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  
 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  
 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  
 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  
 2581 CAG CCA TTT TCT CTG GAG GAG CAG GAG 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  
 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 D S E K N P S K A S Q S S R D T  
 2701 CTG AGC TCA GGC GTA CAC TCC TGG AGC AGC CAG GCC GAG GGT CGA AGC TCC AGC TGG AAG  
 L S S G V H S W S S Q A E A R S S S W N  
 2761 ATG GTG CTG GCC CCG 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

FIG. 6D

2821 CAA ATA CAG TCT CTT AAT GGT GAA CAC CTG CAC ATC CGG GAG TTC CAC CGG GTC AAA GTG  
 Q I Q S L N G E H L H I 2851  
 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 H 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 OOG GCT CCA CAC TGC CGG AAA GCA GGC 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 AGG GCC TCG CAG CAG CAA GGT GGC GGC AAG CAG AAT  
 3211  
 3241 GCC TCC CAG GAT TTC ACA CCT GAG CCC TGC CCC ACC CTG CTG AAA AAA CAT CCG CCA CCT  
 3271  
 3301 GAA GAG ACA GAA GGA TGG CAG GAG TTA CCT GGG GAA ACA AAA CAG GGA TCT TTT TCT  
 3331  
 3361 GCC CCT GCT CCA GTC GAG TTG GCC TGA CCC GCT TGG ATC AGT GAC CAT 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

51  
 52  
 53

3481 CTC CAG GCT GCT GTG AGA GTG TCA AGT GTG TAA GGG CCC AAA CTC AGG TTC AGT 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 AGT GAA GTG GTT CTC AGT CCC CAG ACA  
 3751  
 3781 TGT GCC CCT TTG CTG CTG GCT ACC ACT CTT CCC CAG 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 GAT CAG TGC TAA GGA AAG  
 3931  
 3961 CAG CAG AGA GAG ACG TCC GGC CCC 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 CGG CAC TTT GCA CTC TGA TGA CCT CAA AGC ACT TTC ATG GCT GCC CTC TGG CAG  
 4111

FIG. 6F

4141 GGC AGG GCA GGG CAG TGA CAC TGT AGG AGC ATA GCA AGC 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

FIG. 6G

[illegible]

FIG. 7A

[illegible]

FIG. 7B

FIG. 7C

[illegible]

FIG. 7D

[illegible]

FIG. 7E

|    |           |                                                                   |           |           |           |           |           |           |           |
|----|-----------|-------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| s3 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s4 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s9 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s7 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s2 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s6 | - - - - - | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s8 | 331       | S I I E S N S T L T K S A S P P A S P S Y P S I F R R H H K S S   | 363       |           |           |           |           |           |           |
| s1 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s5 | 225       | E I M K F Q I P Q G K I L S L D A L E A I L Q D L M N R Y H S V V | 257       |           |           |           |           |           |           |
| s3 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s4 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s9 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s7 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s2 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s6 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s8 | 367       | S E S S L I N S L F G S G I G E E A P T K P N P O G H S L S S E N | 396       |           |           |           |           |           |           |
| s1 | -         | - - - - -                                                         | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s5 | 258       | S Y W P N L K K H Y K D K P I T N T A E F T A R I D V M N S U L N | 290       |           |           |           |           |           |           |

FIG. 7F

FIG. 7G

[illegible]

FIG. 7H

FIG. 7I

FIG. 7.7

|      |                                         |             |               |             |           |           |           |
|------|-----------------------------------------|-------------|---------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| s3   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s4   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s9   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s7   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s2   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | FPRPCIL   | 73        |
| s6   | VNRLKNLMEKVSLS                          | TATLSMNSSEL | IPEKHCVI      | 122         |           |           |           |
| s8   | PLTSENNVPLKSVKSKSSMRSGTSSLIASTDDV       | 601         |               |             |           |           |           |
| s1   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s5   | TFANASEAEKWLSSI FENLGAMKRKLNRFSNIL      | 572         |               |             |           |           |           |
| <br> |                                         |             |               |             |           |           |           |
| s3   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s4   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s9   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s7   | - - - - -                               | - - - - -   | - - - - -     | - - - - -   | - - - - - | - - - - - | - - - - - |
| s2   | RFIACNGQTRA VQS RGDY                    | - - - - -   | - - - - -     | QKT LAIALKK | 101       |           |           |
| s6   | F ILNDGSA KKVNVNGCFNADSI KKRLIRRLPHE    | 155         |               |             |           |           |           |
| s8   | S I VTSSSDITSFDEH ASGSGRRYPTPSYY YDR    | 714         |               |             |           |           |           |
| s1   | - - - - -                               | - - - - -   | MVTAVPAVF SKL | 12          |           |           |           |
| s5   | VKAFAQNSA VYQINHN AQL VKKL--KD AHYFL VY | 603         |               |             |           |           |           |

FIG. 7L



[illegible]

FIG. 7N

FIG. 70

[illegible]

FIG. 79

|    |      |     |    |     |    |    |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |      |
|----|------|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| S3 | 12   | EE  | DL | LN  | NS | EV | LD  | ME  | EN | LY | AA | SS | SS | EE | EA | VE | 44   |
| S4 | 12   | EE  | DL | LN  | VS | SD | VD  | ME  | EN | LY | AA | SS | SS | EE | EA | VE | 44   |
| S9 | 278  | HP  | LE | SG  | KL | AC | TH  | HS  | UE | PP | PH | LS | SS | EE | EA | VE | 310  |
| S7 | 1    | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 23   |
| S2 | 351  | QV  | LS | -   | -  | -  | -   | -   | -  | FP | ED | NS | SS | EE | EA | VE | 367  |
| S6 | 369  | -   | -  | -   | -  | -  | -   | -   | -  | RP | ED | NS | SS | EE | EA | VE | 301  |
| S8 | 1037 | QN  | LE | KF  | PR | AN | DK  | PI  | TE | GI | AS | PT | SS | EE | EA | VE | 1069 |
| S1 | 336  | KCK | EE | EA  | EE | EA | LA  | AM  | MA | MA | SA | SA | SS | EE | EA | VE | 368  |
| S5 | 932  | EL  | KE | RV  | -  | -  | -   | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 948  |
| S3 | 45   | BL  | MT | MO  | DS | NS | QN  | KE  | HS | ES | HS | RS | GS | EE | VE | SW | 74   |
| S4 | 45   | SL  | MT | MO  | DS | NS | QN  | KE  | HS | ES | HS | RS | GS | EE | VE | SW | 74   |
| S9 | 311  | KP  | LE | PG  | HL | EP | SC  | LS  | RG | AH | KE | LF | SS | VE | EA | QA | 343  |
| S7 | 24   | V   | RR | SG  | V  | F  | K   | Q   | S  | D  | T  | G  | A  | G  | V  | KE | 56   |
| S2 | 360  | S   | PI | SS  | P  | ES | TH  | SED | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 379  |
| S6 | 302  | LE  | SV | ES  | SS | TH | SED | -   | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 392  |
| S8 | 1070 | SP  | KN | VED | AS | SR | TE  | PS  | TP | SR | PP | DS | SY | EF | IQ | GN | 1102 |
| S1 | 369  | QV  | EN | GED | II | II | QQ  | UT  | PE | TH | PG | HH | -  | -  | -  | -  | 390  |
| S5 | 949  | DV  | MG | ARA | TE | AE | NG  | MG  | QA | RI | NI | DI | TH | EE | EA | VE | 981  |

FIG. 70

|    |      |                                                                     |                                               |         |      |
|----|------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------|------|
| S3 | 75   | S V R Y G T V I E D L                                               | - L A E A N H S N T T K I E Y R O R P         | - - -   | 103  |
| S4 | 75   | S V R Y G T V I E B L                                               | - L A E A N H S N T T K I E Y R O R P         | - - -   | 103  |
| S9 | 344  | S W S S Q A H S L                                                   | - T S L A K P A T W A R S I S K A E S R E P S | K T E   | 375  |
| S7 | 57   | S I R K S S I G I                                                   | - S K A H V N T L E E D T D Q S I             | A R K D | 89   |
| S2 | 380  | - - - - -                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 392  |
| S6 | 393  | - - - - -                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 412  |
| S8 | 1103 | G K N K P L N Q A K T P K R L K T Y R E D A E                       | S D I V S L P I K I A T P                     |         |      |
| S1 | 391  | - - - - -                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 1135 |
| S5 | 982  | E I I N S R I R L E A I K T L E K T M K R N P R Q M G K V L D A T D | - - - - -                                     | - - -   | 402  |
|    |      |                                                                     |                                               |         | 1014 |
| S3 | 104  | D E S G L L N M                                                     | - - - - -                                     | - - -   | 131  |
| S4 | 104  | D E S G L L N M                                                     | - - - - -                                     | - - -   | 131  |
| S9 | 376  | D N E G V L L T E                                                   | - - - - -                                     | - - -   | 401  |
| S7 | 90   | D T P P I                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 94   |
| S2 | 393  | - - - - -                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 393  |
| S6 | 413  | K N                                                                 | - - - - -                                     | - - -   | 414  |
| S8 | 1138 | 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 |
| S1 | 403  | - - - - -                                                           | - - - - -                                     | - - -   | 403  |
| S5 | 1015 | G N K Y L L S L                                                     | - - - - -                                     | - - -   | 1027 |

FIG. 7R

[illegible]

- 80 -

|    |      |                                                                     |                                   |      |   |
|----|------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------|---|
| S3 | 215  | V L E K L E S C G P M R E F E I I                                   | W V T K H V L K E G L D F H S     | 246  | S |
| S4 | 215  | V L G S L S G M S S V A S                                           | - W Y Y T K H V L K E G L D F H S | 246  | S |
| S9 | 477  | I S A S S G S H L A S                                               | - Y Y Y T K H V L K E G L D F H S | 508  | S |
| S7 | 186  | V L G S L S G M S S V A S                                           | - M - F T R T Q F E               | 217  | K |
| S2 | 484  | V L G S L S G M S S V A S                                           | - N - K H - N - Q V               | 515  | S |
| S6 | 542  | V L G S L S G M S S V A S                                           | - N - K H - N - Q V               | 573  | K |
| S8 | 1265 | V L G S L S G M S S V A S                                           | - N - K H - N - Q V               | 1296 | S |
| S1 | 491  | V L G S L S G M S S V A S                                           | - N - K H - N - Q V               | 522  | E |
| S5 | 1120 | V L G S L S G M S S V A S                                           | - N - K H - N - Q V               | 1151 | Q |
| S3 | 247  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 275                               | V    |   |
| S4 | 247  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 275                               | V    |   |
| S9 | 509  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 541                               | V    |   |
| S7 | 218  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 249                               | V    |   |
| S2 | 516  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 547                               | V    |   |
| S6 | 574  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 604                               | V    |   |
| S8 | 1297 | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 1327                              | V    |   |
| S1 | 523  | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 555                               | V    |   |
| S5 | 1152 | K K V I H H D I K G A N I N N S P P K I E S C C G G P M R E F E I I | 1103                              | V    |   |

FIG. 7U

[illegible]

FIG. 7V

[illegible]

FIG. 7W

[illegible]

FIG. 7X

|    |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |     |     |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|-----|-----|
| S3 | 418 | E | P | E | N | A | D | S | S | G | T | G | S | S | T | E | E | S | E | V | R | H | C | R | S | H | V | D | R | S | A    | 450 |     |
| S4 | 418 | E | P | E | N | A | D | S | S | G | T | G | S | S | T | E | E | S | E | V | R | H | C | R | S | H | V | D | R | S | A    | 450 |     |
| S9 | 720 | E | P | E | P | N | K | S | P | R | L | T | S | S | K | E | E | S | G | M | E | P | L | P | S | S | L | D | P | A | 752  |     |     |
| S7 | 425 | E | P | E | S | L | W | K | L | G | N | S | D | D | D | M | C | Q | M | D | N | D | F | M | F | G | A | S | S | D | 457  |     |     |
| S2 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 659  |     |     |
| S6 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 717  |     |     |
| S8 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1478 |     |     |
| S1 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 672  |     |     |
| S5 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1314 |     |     |
| S3 | 451 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 461  |     |     |
| S4 | 451 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 461  |     |     |
| S9 | 753 | A | R | N | P | S | S | P | E | R | K | A | T | V | P | E | Q | E | L | Q | Q | L | E | I | E | I | S | S | Q | P | 785  |     |     |
| S7 | 458 | H | S | P | A | N | Y | K | S | F | N | P | M | C | E | P | D | N | D | W | P | C | K | H | D | E | S | P | E | K | S    | Q   | 490 |
| S2 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 659  |     |     |
| S6 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 717  |     |     |
| S8 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1478 |     |     |
| S1 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 672  |     |     |
| S5 | 0   | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1314 |     |     |

FIG. 7Y

[illegible]

FIG. 72

[illegible]

FIG. 7AA

[illegible]

FIG. 7BB

Konec dokumentu