PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2002 -3698

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:

C 07 K 14/715	A 61 P 31/00
C 07 K 16/24	A 61 P 37/00
C 12 N 15/12	
A 61 K 39/395	
A 61 K 38/19	
A 61 P 19/00	
A 61 P 25/00	
A 61 P 17/06	

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.05.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.05.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/203426**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.04.2003**
(Věstník č. 4/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/15057**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/085790**

(71) Přihlašovatel:
SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Původce:
Chiraca Madaline, Palo Alto, CA, US;
Kastelein Robert A., Redwood City, CA, US;
Moore Kevin W., Palo Alto, CA, US;
Parham Christi L., San Francisco, CA, US;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Savčí receptorové proteiny, činidla a metody, které se jich týkají

(57) Anotace:

Popisují se nukleové kyseliny kódující savčí receptory, například receptory primátů, izolované receptorové proteiny a jejich fragmenty. Dále se popisují polyklonální a monoklonální protilátky a způsoby použití prostředků pro diagnostické a terapeutické použití.

CZ 2002 - 3698 A3

14.01.03

PV 2002-3698

Savčí receptorové proteiny, činidla a metody, které se jich týkají

Oblast techniky

Vynález popisuje prostředky a metody ovlivnění fyziologie savců zahrnující funkci imunitního systému. Zvláště se popisují metody regulující vývoj a/nebo imunitní systém. Popisuje se také diagnostická a terapeutická použití těchto materiálů.

Dosavadní stav techniky

Technologie rekombinace DNA znamená v obecném případě způsob začlenění genetické informace z dárce do vektorů za účelem dalšího zpracování. Vektory se mohou zavést do hostitele, kde se vytvoří kopie přenesené genetické informace, a/nebo se exprimují v novém prostředí. V běžném případě existuje genetická informace ve formě komplementární DNA (cDNA) získané z messengerové RNA (mRNA) kódující požadovaný proteinový produkt. Nosičem je často plazmid, který vykazuje kapacitu začlenit cDNA za účelem pozdější replikace do hostitele a v některých případech dokonce řídit expresi cDNA, čímž řídí syntézu kódovaného produktu v hostiteli (popisuje se například v publikaci Sambrook, et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2d ed.) vls. 1-3, CSH Press, NY).

Je známo, že imunitní odezva savců je založena na sérii komplexních buněčných interakcí, které se nazývají „imunitní síť". Současný výzkum poskytuje nový pohled na vnitřní vazby v této síti. Zatímco je zřejmé, že ve skutečnosti se imunitní odezva příliš nepodílí na interakcích lymfocytů, makrofágů, granulocytů a jiných buněk, imunologové v současné době prosazují názor, že rozpustné proteiny známé jako lymfokiny,

cytokiny nebo monokiny mají důležitou úlohu při řízení těchto buněčných interakcí. Je důležité izolovat a charakterizovat buněčné modulační faktory a porozumět jejich mechanizmu působení, což povede ke zlepšení diagnózy a terapie řady zdravotních abnormalit, například poruch imunitního systému.

Lymfokiny zjevně různým způsobem zprostředkovávají buněčné aktivity (popisuje se například v publikaci Paul (ed. 1996) Fundamental Immunology 3d ed., Raven Press, New York a Thomson (ed.1994) The Cytokine Handbook 2d ed., Academic Press, San Diego). Ukazuje se, že cytokiny podporují proliferaci, růst a/nebo diferenciaci pluripotencionálních krvetvorných kmenových buněk do nesmírného počtu progenitorů, které obsahují odlišné diverzní linie, jenž tvoří komplexní imunitní systém. Správné a vyvážené interakce mezi buněčnými komponenty jsou nezbytné pro zdravou imunitní odpověď. V případě, že se lymfokiny aplikují ve spojení s jinými činidly, různé buněčné linie často odpovídají odlišným způsobem.

Buněčné linie, které jsou zvláště důležité pro imunitní odezvu zahrnují dvě třídy lymfocytů: B-buňky, které mohou produkovat a vylučovat imunoglobuliny (proteiny se schopností rozeznávat a vázat se na cizorodé látky za účelem jejich odstranění) a T-buňky různých subtypů, které vylučují lymfokiny a vyvolávají a potlačují B-buňky a různé jiné buňky (zahrnující jiné T-buňky), které tvoří imunitní síť. Tyto lymfokiny reagují s řadou jiných typů buněk.

Překážkou výzkumu za účelem lépe porozumět a léčit různé poruchy imunity je obecná neschopnost udržet buňky imunitního systému in vitro. Imunologové zjistily, že kultivace řady buněk může být doprovázena použitím T-buněk a jiných buněčných supernatantů, které obsahují různé růstové faktory zahrnující řadu lymfokinů.

Existují různé růstové a regulační faktory, které modulují morfogenní vývoj. Je známa řada receptorů vhodných pro cytokiny. Často ve funkčním receptoru existují alespoň dvě kritické podjednotky (popisuje se v publikaci Heinrich, et al., (1998) Biochem. J. 334: 297-314, Gonda and D´Andrea (1997) Blood 89: 355-369, Presky, et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14002-14007, Drachman and Kaushansky (1995) Curr. Opin. Hematol. 2: 22-28, Theze (1994) Eur. Cytokine Netw. 5: 353-368 a Lemmon and Schlessinger (1994) Trends Biochem. Sci. 19: 459-463).

Se shora uvedených informací vyplývá, že objev a vývoj nových rozpustných proteinů a jejich receptorů, které zahrnují ty podobné lymfokinům, by se mohly podílet na nových terapiích širokého rozsahu degenerativních nebo abnormálních podmínek, které přímo nebo nepřímo zahrnují vývoj, diferenciaci nebo funkci například imunitního systému a/nebo krvetvorných buněk. Velmi výhodné bude objevení a porozumění funkci nových receptorů vhodných pro molekuly podobné lymfokinům, které zesilují nebo umocňují výhodné aktivity jiných lymfokinů. Vynález popisuje nové receptory ligandů, které vykazují podobnost s látkami, jenž jsou podobné cytokinům, a příbuzné sloučeniny a metody jejich použití.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje nové receptory příbuzné receptorům cytokinů, jako jsou například molekulové struktury podobné receptorům cytokinů, označované podjednotky receptorů cytokinů DNAX (DCRS), a jejich biologické aktivity. Vynález zvláště popisuje jednu podjednotku označovanou DCRS5. Vynález také zahrnuje nukleové kyseliny kódující samotné polypeptidy a metody jejich produkce a využití. Nukleové kyseliny podle vynálezu se charakterizují svou homologií se zde uvedenými klonovanými komplementárními sekvencemi DNA (cDNA).

Navíc vynález popisuje spojení ligandu p40/IL-B30 s podjednotkami receptoru DCRS5 a IL-12Rβ1, přičemž uvedené párování je indikací pro použití agonistů a antagonistů založených na činidlech řízených na tyto receptory.

Vynález popisuje v podstatě čisté nebo rekombinantní polypeptid obsahující alespoň deset sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části se sekvencí SEQ ID NO: 2. V jistých provedeních vynálezu polypeptid obsahuje alespoň 25 sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části se sekvencí SEQ ID NO: 2. Dále může být polypeptid rekombinantní obsahující vnitrobuněčnou část sekvence SEQ ID NO: 2. Dále může polypeptid obsahovat alespoň deset sousedících aminokyselin části, která není extrabuněčná a je popsána sekvencí SEQ ID NO: 2, nebo přirozenou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo je v podstatě čistým přirozeným polypeptidem. Mezi jinými rekombinantní polypeptid může obsahovat přirozenou sekvenci uvedenou v tabulce č. 1 a je neglykosylovaným polypeptidem, pochází z člověka, obsahuje alespoň 40 sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2, vykazuje alespoň tři nepřekrývající se segmenty tvořené z 15-ti sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2, je přirozená polymorfní varianta sekvence SEQ ID NO: 2, má délku alespoň okolo 30-ti aminokyselin, vykatuje alespoň dva nepřesahující epitopy, které jsou specifické pro DCRS5 primáta, má molekulovou hmotnost alespoň 30 000 s přirozenou glykosylací, je syntetickým polypeptidem, existuje ve sterilní formě, je ve vodném nebo pufrovaném roztoku, je připojen na pevný substrát, je konjugovaný s jinou chemickou částí nebo je fyzikálně spojen s polypeptidem IL-12Rβ1.

Jiná provedení vynálezu popisují v podstatě čistý nebo rekombinantní polypeptid obsahující alespoň dva odlišné nepřekrývající se segmenty alespoň šesti sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2,

v podstatě čistý nebo rekombinantní polypeptid obsahující alespoň dvanáct sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2 nebo v podstatě čistou přirozenou sekvenci polypeptidu obsahující zralou sekvenci SEQ ID NO: 2. Polypeptidy se mohou vyskytovat v určitých formách, polypeptid obsahuje alespoň dva rozdílné nepřekrývající se segmenty tvořené alespoň šesti sousedícími aminokyselinami vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2, kde rozdílné nepřekrývající se segmenty zahrnují jeden tvořený alespoň dvanácti aminokyselinami, zahrnují jeden tvořený alespoň sedmi aminokyselinami a druhý tvořený alespoň devíti aminokyselinami, zahrnuje třetí odlišný seggment tvořený alespoň šesti aminokyselinami nebo obsahuje jeden segment vybraný z R3555-L373, P378-L405, V407-D426, K428-D439, P441-V452, I454-G460, I465-T587 nebo N592-606 nebo polyppetid dále obsahuje alespoň dva rozdílné nepřekrývající se segmenty tvořené alespoň šesti sousedícími aminokyselinami extrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2. V jiném případě polypeptid obsahující alespoň dvanáct sousedících aminokyselin intrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2 bude ten, kde segment s dvanácti aminokyselinami obsahuje jeden z R355-L373, P378-L405, V407-D426, K428-D439, P441-V452, I454-G460, I465-T587 nebo N592-606, nebo polypeptid dále obsahuje alespoň dva odlišné nepřesahující segmenty tvořené alespoň šesti sousedícími aminokyselinami extrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2. Nebo čistá, přirozená sekvence polypeptidu obsahující zralou sekvenci SEQ ID NO: 2 může dále obsahovat epitop vhodný pro čištění nebo detekci. Takové polypeptidy mohou obsahovat zralou sekvenci uvedenou v tabulce č. 1, může být neglykosylovaným polypeptidem, může pocházet z člověka, obsahuje alespoň 40 sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2, vykazuje alespoň tři nepřesahující segmenty alespoň 15-ti sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2, je přirozenou polymorfní variantou sekvence SEQ ID NO: 2, má

délku alespoň přibližně 30 aminokyselin, vykazuje alespoň dva nepřekrývající se epitopy, které jsou specifické pro DCRS5 primátů, mají molekulovou hmotnost alespoň 30 000 s přirozenou glykosylací, je syntetickým polypeptidem, je ve sterilní formě, vyskytuje se ve vodném nebo pufrovaném roztoku, je zachycen na pevném substrátu, je konjugován s jinou chemickou částí nebo je fyzikálně spojen s polypeptidem IL-12Rβ1.

Vynález popisuje různé jiné prostředky, které například obsahují v podstatě čistý polypeptid kombinovaný s proteinem IL-12Rβ1, nebo takový polypeptid a nosičem, kde nosič je vodná sloučenina zahrnující vodu, fyziologický roztok a/nebo pufr a/nebo je upraven pro orální, rektální, nasální, povrchovou nebo parenterální aplikaci.

Vynález popisuje sady obsahující popsaný polypeptid a kompartmen s polypeptidem, kompartment obsahující polypeptid IL-12Rβ1, kompartment obsahující p40, IL-B30 nebo polypeptid p40/IL-B30 nebo instrukce vhodné pro použití nebo likvidaci činidel v sadě.

Popisují se protilátky a jiné vazebné sloučeniny, které například obsahují vazebné místo na antigen pocházející z protilátek, které specificky váže vnitrobuněčnou část DCRS5, kde vazebná sloučenina je v kontejneru, polypeptid pochází z člověka, vazebná sloučenina může být fragment Fv, Fab nebo Fab2, vazebná sloučenina se konjugovala s jinou chemickou částí. Protilátka je řízena proti peptidové sekvenci zralého polypeptidu uvedené v tabulce č. 1, protilátka je určena proti zralému DCRS5, proti zralému DCRS5, čištěnému lidskému DCRS5, vybrala se imunologickou metodou, je polyklonální protilátkou, váže se na denaturovaný DCRS5, vykazuje hodnotu konstanty Kd vůči antigenu alespoň 30 μm, je zachycena na pevném substrátu, který zahrnuje kuličky nebo plastovou membránu, je ve formě sterilního prostředku nebo je detekovatelně značená, přičemž

zahrnuje radioaktivní nebo fluorescenční značky. Také se popisují sady obsahující vazebnou sloučeninu a kompartment obsahující vazebnou sloučeninu, kompartment obsahující polypeptid p40, polypeptid IL-B30, polypeptid DCRS5 a/nebo polypeptid IL-12Rβ1, kompartment obsahující protilátku, která se selektivně váže na polypeptid p40, polypeptid IL-B30, polypeptid DCRS5 a/nebo polypeptid IL-12Rβ1 nebo instrukce pro použití nebo likvidaci činidel obsažených v sadě.

Vynález dále popisuje metody například produkci komplexu antigen:protilátka zahrnující kontakt polypeptidu primáta DCRS5 s protilátkou za vhodných podmínek, což umožňuje vytvoření komplexu. Taková metoda se může použít při izolaci komplexu od jiných cytokinových receptorů, komplex se izoluje od jiné protilátky, kontakt je se vzorkem, který obsahuje interferon, kontakt umožňuje kvantitativní detekci antigenu, kontakt je se vzorkem obsahujícím protilátku nebo kontakt umožňuje kvantitativní detekci protilátky. Vynález popisuje i jiné prostředky. Je to například prostředek obsahující sterilní vazebnou sloučeninu nebo vazebnou sloučeninu a nosič, kde nosičem je vodná sloučenina zahrnující vodu, fyziologický roztok a/nebo pufr a/nebo je upravena pro orální, rektální, nasální nebo povrchovou nebo parenterální aplikaci.

Vynález také popisuje izolovanou nebo rekombinantní nukleovou kyselinu kodující polypeptid DCRS5, kde DCRS5 pochází z člověka, nebo nukleovou kyselinu kódující sekvenci antigenního peptidu uvedenou v tabulce č. 1 nebo kóduje velké množství sekvencí antigenních peptidů uvedených v tabulce č. 1, vykazuje shodu alespoň 14-ti nukleotidů s přirozenou cDNA kódující segment, je expresívním vektorem, dále obsahuje počátek replikace, pochází z přirozeného zdroje, obsahuje detekovatelnou značku, obsahuje syntetickou nukleotidovou sekvenci, ale menší než 6 kb, přednostně je menší než 3 kb, pochází z primátu, obsahuje přirozenou kodující sekvenci plné

délky, je hybridizační sondou pro gen kodující DCRS5 nebo je primer PCR, produkt PCR nebo primer pro mutagenezi. Popisují se buňky obsahující rekombinantní nukleovou kyselinu zahrnující prokaryontní buňku, eukaryontní buňku, bakteriální buňku, kvasinkovou buňku, hmyzí buňku, myší buňku, buňku primáta nebo lidskou buňku.

Vynález dále popisuje sadu, která obsahuje nukleovou kyselinu a za kompartment obsahující nukleovou kyselinu, kompartment obsahující nukleovou kyselinu kodující polypeptid p40, polypeptid Il-B30, polypeptid DCRS5 a/nebo polypeptid IL-12Rβ1, kompartment obsahující protilátku, která se selektivně váže na polypeptid p40, polypeptid IL-B30, polypeptid DCRS5 a/nebo polypeptid IL-12Rβ1 nebo instrukce pro použití nebo likvidaci činidel v sadě.

Vynález dále popisuje nukleovou kyselinu, která hybridizuje za podmínek promývání po dobu 30 minut při teplotě 30 °C a v méně než 2 mM soli s částí sekvence SEQ ID NO: 1 kodující vnitrobuněčnou část nebo vykazující shodu pruhu alespoň 30-ti nukleotidů s vnitrobuněčnou částí DCRS5 primáta. Taková nukleová kyselina je s výhodou ta, kde promývací podmínky hybridizace jsou teplota 45 °C a/nebo 500 mM sůl nebo teplota 55 °C a/nebo 150 mM sůl nebo pruh je tvořen alespoň 55 nebo 75 nukleotidy.

Terapeutické použití zahrnuje způsoby modulace fyziologie nebo vývoje buňky zahrnující kontakt buňky s antagonistou p40/IL-B30, který je komplex obsahující extrabuněčnou část DCRS5 primáta a/nebo extrabuněčnou část IL-12Rβ1 primáta, antagonistou p40/IL-B30, který je protilátkou vázající se na komplex obsahující DCRS5 primáta a/nebo IL-12Rβ1, antagonistou p40/IL-B30, který je protilátkou vůči IL-12Rβ1, antagonistou p40/IL-B30, který je antisense nukleová kyselina vůči DCRS5

nebo IL-12Rβ1 nebo agonistou p40/IL-B30, který je protilátkou vázající se na komplex obsahující DCRS5 primáta a/nebo IL-12Rβ1 primáta. Při jednom typu metod ke kontaktu dochází s antagonistou a kontakt probíhá v kombinaci s antagonistou vůči IL-12, IL-18, TNF a/nebo IFNγ nebo buňka pochází z hostitele, který vykazuje znaky nebo symptomy chronického onemocnění zprostředkované TH1, vykazuje symptomy nebo znaky roztroušené sklerózy, revmatické artritidy, osteoartritidy, zánětlivého onemocnění střev, cukrovky, lupénky nebo sepse, nebo hostitel obdržel alogenní transplantáty. Naopak způsob může zahrnovat kontakt s agonistou a pak ke kontaktu dochází v kombinaci s IL-12, IL-18, TNF nebo IFNγ nebo buňka pochází z hostitele, který vykazuje znaky nebo symptomy chronické odezvy Th2, trpí růstem nádoru, virovým nebo plísňovým onemocněním, aplikovala se mu vakcína nebo trpí alergickou odpovědí.

Osnova

I. Obecně

II. Aktivity

III. Nukleové kyseliny

A. kodující fragmenty, sekvence, sondy

B. mutace, chimery, fúze

C. příprava nukleových kyselin

D. vektory, buňky obsahující vektory

IV. Proteiny, peptidy

A. fragmenty, sekvence, imunogeny, antigeny

B. muteiny

C. agonisty/antagonisty, funkční ekvivalenty

D. příprava proteinů

V. Příprava nukleových kyselin, proteinů

A. syntetické

B. rekombinantní

C. přirozené zdroje

VI. Protilátky

A. polyklonální

B. monoklonální

C. fragmenty, Kd

D. anti-idiotypické protilátky

E. buněčné linie hybridomů

VII. Sady, diagnostika a kvantifikace

A. ELISA

B. test mRNA kodující

C. kvalita/kvantita

D. sady

VIII. Terapeutické prostředky, metody

A. kombinační prostředky

B. jednotková dávka

C. aplikace

IX. Testování

I. Obecně

Vynález popisuje aminokyselinovou sekvenci a sekvenci DNA savce, v tomto případě primáta, podjednotky molekul podobných receptoru cytokinu, kdy tato podjednotka označená podjednotka 5 receptoru cytokinu DNAX (DCRS5) má určitým způsobem definované vlastnosti a to jak strukturní tak biologické. Různé cDNA kodující tyto molekuly se získaly z primáta, například z knihovny sekvencí lidské cDNA. Požadují se také části z jiných primátů nebo savců.

Navíc vynález popisuje párování ligandu p40/IL-B30 s podjednotkami receptoru DCRS5 a IL-12Rβ1, jejichž párování poskytuje proniknutí do indikací použití agonistů a antagonistů založených na činidlech.

Některá ze standardních metod se popisují v publikaci Maniatis, et al., (1982) Molecular Cloning, A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Sambrook, et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2d ed.), vols. 13, CSH Press NY, Ausubel, et al., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY nebo Ausubel, et al., (1987 a periodické doplňky) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York).

Nukleotidová (SEQ ID NO: 1) a odpovídající aminokyselinová sekvence (SEQ ID NO: 2) primáta, jako je například člověk, kodující segment DCRS5 je zobrazena v tabulce č. 1. Předpokláná signální sekvence je určena, ale může záviset na typu buněk nebo může obsahovat v obou směrech několik zbytků navíc. Potenciální a glykosylační zbytky jsou asparagin 6, 24, 58, 118, 157, 209 a 250. Je pravděpodobné, že disulfidové můstky se nacházejí mezi cysteinovými zbytky v polohách 29 a 78 a konzervovaný motiv C_CXW se nachází v polohách 110/121/123. V poloze 219 je patrný tryptofan a motiv WxxWS je patrný od polohy 281 do 285. Segment v polohách 1 až 101 je v doméně Ig, v polohách 102 do 195 je doména 1 vázající cytokin, v polohách 196 až 297 je doména 2 vázající cytokin, oblast 298 až 330 je linker, oblast 329 až 354 je transmembránový segment a oblast 356 až 606 je vnitrobuněčná oblast. Vnitrobuněčné rysy zahrnují vazebná místa putativní SH2 v polohách Y374-I377, Y461-Q464 a Y588-Q591 a potencionálně důležité tyrosinové zbytky v poloze 406, 427, 440 a 453. Tato místa a hranice jsou patrné.

ORF obsahuje putativní signální sekvenci. Předpokládá se, že tato sekvence bude štěpena v místě CHG/GIT, jak se uvádí shora v textu. Předpovězenou extrabuněčnou oblast obsahující 328 aminokyselin následuje putativní transmembránový segment a nakonec cytoplazmatická oblast obsahující přibližně 252 aminokyselin. Funkce vázat ligand přináleží zbytku v extrabuněčné oblasti.

Reverzní translace sekvence nukleové kyseliny je uvedena v tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Nukleotidové a polypeptidové sekvence forem podobných podjednotce receptoru cytokinu DNAX (DCRS5). Forma primáta například člověk (SEQ ID NO: 1 a 2). Předpokládaná signální sekvence je určená, ale může se měnit v několika polohách a závisí na typu buněk. Určité polohy variace jsou v nukleotidech 127 a 563, ve kterých se párují G a G (překládají se na kombinace Q a G) nebo T a A (překládají se na H a R).

```
gtggtacggg aattccattg tgttgggcag ccaacaaggg tggcagcctg gctctgaagt 60

ggaattatgt gcttcaaaca ggttgaaaga gggaaacagt cttttcctgc ttccagac   118

atg aat cak gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata    166
Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
            -20                 -15                 -10

ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc    214
Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
        -5              -1  1               5

cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc    262
His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
 10                  15                  20                  25

tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt    310
Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
                30                  35                  40

cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att    358
His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
            45                  50                  55

aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat    406
Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
        60                  65                  70

gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca    454
Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
    75                  80                  85

ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct    502
Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
 90                  95                  100                 105

gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc    550
Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
                110                 115                 120

acc tgg aat gct rgg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta    598
Thr Trp Asn Ala Xaa Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
            125                 130                 135
```

14.01.03

```
cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca   646
His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
        140                 145                 150
agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac   694
Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr
    155                 160                 165

ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa   742
Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
170                 175                 180                 185

caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc   790
Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
                190                 195                 200

att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att   838
Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
            205                 210                 215

tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga   886
Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
        220                 225                 230

tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc   934
Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
    235                 240                 245

aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att   982
Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
250                 255                 260                 265

aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg  1030
Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
                270                 275                 280

cag cct tgg agt tca ccg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc  1078
Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
            285                 290                 295

cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta  1126
Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
        300                 305                 310

aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga  1174
Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
    315                 320                 325

gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca  1222
Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
330                 335                 340                 345

att ctt tct ttg att ggg ata ttt aa  ga tca ttc cga act ggg att  1270
Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe As. Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
                350                 355                 360

aaa aga agg atc tta ttg tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att  1318
Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
            365                 370                 375
```

```
cct aat atg aaa aac agc aat gtt gtg aaa atg cta cag gaa aat agt   1366
Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
        380                 385                 390

gaa ctt atg aat aat aat tcc agt gag cag gtc cta tat gtt gat ccc   1414
Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro
    395                 400                 405

atg att aca gag ata aaa gaa atc ttc atc cca gaa cac aag cct aca   1462
Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
410                 415                 420                 425

gac tac aag aag gag aat aca gga ccc ctg gag aca aga gac tac ccg   1510
Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
                430                 435                 440

caa aac tcg cta ttc gac aat act aca gtt gta tat att cct gat ctc   1558
Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
            445                 450                 455

aac act gga tat aaa ccc caa att tca aat ttt ctg cct gag gga agc   1606
Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
        460                 465                 470

cat ctc agc aat aat aat gaa att act tcc tta aca ctt aaa cca cca   1654
His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
    475                 480                 485

gtt gat tcc tta gac tca gga aat aat ccc agg tta caa aag cat cct   1702
Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
490                 495                 500                 505

aat ttt gct ttt tct gtt tca agt gtg aat tca cta agc aac aca ata   1750
Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile
                510                 515                 520

ttt ctt gga gaa tta agc ctc ata tta aat caa gga gaa tgc agt tct   1798
Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser
            525                 530                 535

cct gac ata caa aac tca gta gag gag gaa acc acc atg ctt ttg gaa   1846
Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu
        540                 545                 550

aat gat tca ccc agt gaa act att cca gaa cag acc ctg ctt cct gat   1894
Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp
    555                 560                 565

gaa ttt gtc tcc tgt ttg ggg atc gtg aat gag gag ttg cca tct att   1942
Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile
570                 575                 580                 585

aat act tat ttt cca caa aat att ttg gaa agc cac ttc aat agg att   1990
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile
                590                 595                 600
```

tca ctc ttg gaa aag tagagctgtg tggtcaaaat caatatgaga aagctgcctt 2045
Ser Leu Leu Glu Lys
605

gcaatctgaa cttgggtttt ccctgcaata gaaattgaat tctgcctctt tttgaaaaaa 2105

atgtattcac atacaaatct tcacatggac acatgttttc atttcccttg gataaatacc 2165

taggtagggg attgctgggc catatgataa gcatatgttt cagttctacc aatcttgttt 2225

ccagagtagt gacatttctg tgctcctacc atcaccatgt aagaattccc gggagctcca 2285

tgccttttta attttagcca ttcttctgcc tmatttctta aaattagaga attaaggtcc 2345

cgaaggtgga acatgcttca tggtcacaca tacaggcaca aaaacagcat tatgtggacg 2405

cctcatgtat tttttataga gtcaactatt tcctctttat tttccctcat tgaaagatgc 2465

aaaacagctc tctattgtgt acagaaaggg taaataatgc aaaatacctg gtagtaaaat 2525

aaatgctgaa aattttcctt taaaatagaa tcattaggcc aggcgtggtg gctcatgctt 2585

gtaatcccag cactttggta ggctgaggtr ggtggatcac ctgaggtcag gagttcgagt 2645

ccagcctggc caatatgctg aaaccctgtc tctactaaaa ttacaaaaat tagccggcca 2705

tggtggcagg tgcttgtaat cccagctact tgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa 2765

ccaggaaggc agaggttgca ctgagctgag attgtgccac tgcactccag cctgggcaac 2825

aagagcaaaa ctctgtctgg aaaaaaaaaa aaaa 2859

MN(Q/H)VTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCSGHIWVEPATIFKMGMNISIYCQAAIKNCQPRKLHF
YKNGIKERFQITRINKTTARLWYKNFLEPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIY
EYSGNMTCTWNA(G/R)KLTYIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSSYINISTDSLQGGKKYLVWVQAANAL
GMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKTIIYWDSQTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFDT
NFTYVQQSEFYLEPNIKYVFQVRCQETGKRYWQPWSSPFFHKTPETVPQVTSKAFQHDTWNSGLTVASIS
TGHLTSDNRGDIGLLLGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRRILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKML
QENSELMNNNSSEQVLYVDPMITEIKEIFIPEHKPTDYKKENTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNT
GYKPQISNFLPEGSHLSNNNEITSLTLKPPVDSLDSGNNPRLQKHPNFAFSVSSVNSLSNTIFLGELSLI
LNQGECSSPDIQNSVEEETTMLLENDSPSETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQNILESHFN
RISLLEK

Tabulka č. 2: Reverzní translace DCRS5 primáta, například člověka (SEQ ID NO: 3)

ATGAAYCAYGTNACNATHCARTGGGAYGCNGTNATHGCNYTNTAYATHYTNTTYWSNTGGTGYCAYGGNGGNAT
HACNAAYATHAAYTGYWSNGGNCAYATHTGGGTNGARCCNGCNACNATHTTYAARATGGGNATGAAYATHWSNA
THTAYTGYCARGCNGCNATHAARAAYTGYCARCCNMGNAARYTNCAYTTYTAYAARAAYGGNATHAARGARMGN
TTYCARATHACNMGNATHAAYAARACNACNGCNMGNYTNTGGTAYAARAAYTTYYTNGARCCNCAYGCNWSNAT
GTAYTGYACNGCNGARTGYCCNAARCAYTTYCARGARACNYTNATHTGYGGNAARGAYATHWSNWSNGGNTAYC
CNCCNGAYATHCCNGAYGARGTNACNTGYGTNATHTAYGARTAYWSNGGNAAYATGACNTGYACNTGGAAYGCN
MGNAARYTNACNTAYATHGAYACNAARTAYGTNGTNCAYGTNAARWSNYTNGARACNGARGARGARCARCARTA
YYTNACNWSNWSNTAYATHAAYATHWSNACNGAYWSNYTNCARGGNGGNAARAARTAYYTNGTNTGGGTNCARG
CNGCNAAYGCNYTNGGNATGGARGARWSNAARCARYTNCARATHCAYYTNGAYGAYATHGTNATHCCNWSNGCN
GCNGTNATHWSNMGNGCNGARACNATHAAYGCNACNGTNCCNAARACNATHATHTAYTGGGAYWSNCARACNAC
NATHGARAARGTNWSNTGYGARATGMGNTAYAARGCNACNACNAAYCARACNTGGAAYGTNAARGARTTYGAYA
CNAAYTTYACNTAYGTNCARCARWSNGARTTYTAYYTNGARCCNAAYATHAARTAYGTNTTYCARGTNMGNTGY
CARGARACNGGNAARMGNTAYTGGCARCCNTGGWSNWSNCCNTTYTTYCAYAARACNCCNGARACNGTNCCNCA
RGTNACNWSNAARGCNTTYCARCAYGAYACNTGGAAYWSNGGNYTNACNGTNGCNWSNATHWSNACNGGNCAYY
TNACNWSNGAYAAYMGNGGNGAYATHGGNYTNYTNYTNGGNATGATHGTNTTYGCNGTNATGYTNWSNATHYTN
WSNYTNATHGGNATHTTYAAYMGNWSNTTYMGNACNGGNATHAARMGNMGNATHYTNYTNYTNATHCCNAARTG
GYTNTAYGARGAYATHCCNAAYATGAARAAYWSNAAYGTNGTNAARATGYTNCARGARAAYWSNGARYTNATGA
AYAAYAAYWSNWSNGARCARGTNYTNTAYGTNGAYCCNATGATHACNGARATHAARGARATHTTYATHCCNGAR
CAYAARCCNACNGAYTAYAARAARGARAAYACNGGNCCNYTNGARACNMGNGAYTAYCCNCARAAYWSNYTNTT
YGAYAAYACNACNGTNGTNTAYATHCCNGAYYTNAAYACNGGNTAYAARCCNCARATHWSNAAYTTYYTNCCNG
ARGGNWSNCAYYTNWSNAAYAAYAAYGARATHACNWSNYTNACNYTNAARCCNCCNGTNGAYWSNYTNGAYWSN
GGNAAYAAYCCNMGNYTNCARAARCAYCCNAAYTTYGCNTTYWSNGTNWSNWSNGTNAAYWSNYTNWSNAAYAC
NATHTTYYTNGGNGARYTNWSNYTNATHYTNAAYCARGGNGARTGYWSNWSNCCNGAYATHCARAAYWSNGTNG
ARGARGARACNACNATGYTNYTNGARAAYGAYWSNCCNWSNGARACNATHCCNGARCARACNYTNYTNCCNGAY
GARTTYGTNWSNTGYYTNGGNATHGTNAAYGARGARYTNCCNWSNATHAAYACNTAYTTYCCNCARAAYATHYT
NGARWSNCAYTTYAAYMGNATHWSNYTNYTNGARAAR

Tabulka č. 3: Uspořádání podjednotek různých cytokinových receptorů, protein gp130 receptoru lidského IL-6 je SEQ ID NO: 4 (GenBank M57230), podjednotka beta2 receptoru lidského Il-12 je SEQ ID NO:5 (GenBank U64198)

```
huIL-12R 2    1   MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVN  48
hugp130       1   MLTLQTWVVQALFIFLTTESTGELLDPCG---YISPESPVVQLHSNFT  45
huDCRS5       1 MNHVTIQWDAVIALYILFSWCHGGITNINCS-GHIWVEPATIFKMGMNIS  49
                              *    .         *       . . . .

huIL-12R 2   49 ITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLG---  95
hugp130      46 AVCVLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIA  95
huDCRS5      50 IYCQAAIKN--CQP--RKLHFYKNGIKER-FQITRINKTTARLWYKNFL  93
                   *   .           .       .  .*   . .

huIL-12R 2   96 --TTLFVCKLACINSD-EIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVA 142
hugp130      96 SLNIQLTCNILTFGQL-EQNVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVN-EGKKMR 143
huDCRS5      94 EPHASMYCTAECPKHFQETLICGKDISSGYPPDIPDEVTCVIYEYSGNMT 143
                      *   .    *  .* * * *. *  ..*.       .

huIL-12R 2  143 CTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESP 192
hugp130     144 CEWDGGRETHLETNFTLKS--EWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYS-TVY 190
huDCRS5     144 CTWNARKLTYIDTKYVVHVKSLETEEEQQYLTSSYINISTDSLQGG---- 189
                  * *   . * . * . ..                    .

huIL-12R 2  193 ESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRC 242
hugp130     191 FVNIEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSIL 240
huDCRS5     190 -KKYLVWVQAANALGMEESKQLQIHLDDIVIPSAAVISRAETINATVPKT 238
                      * * *.**   *         * *

huIL-12R 2  243 TLYWRD----EGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVN---VTKAKGRHDLLDLK 285
hugp130     241 KLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLK 290
huDCRS5     239 IIYWDS--QTTIEKVSCEMRYKATTNQTWNVKEFD-TNFTYVQQSEFYLE 285
                  . *       .   ..*.     *         .        *

huIL-12R 2  286 PFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHID 335
hugp130     291 PFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSH 340
huDCRS5     286 PNIKYVFQVRCQ-ETGKRYWQPWSSPFFHKTPETVP-------------- 320
                  *   * *.. .     *  *  **      * *  *

huIL-12R 2  336 YS-RQQISLFWKNLSVSEARGKI HYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWT 384
hugp130     341 TQGYRTVQLVWKTLPPFEANGK  DYEVT---LTRWKSHLQNYTVNATKL 387
huDCRS5     321 -----QVTSKAFQHDTWNSGLT  ISTG------HLTSDN--RGDIGLL 357
                        .       .  .       . .

huIL-12R 2  385 TVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGM 434
hugp130     388 TVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIP-ACDFQATHPVMDLKAFPKD 436
huDCRS5     358 LGMIVFAVMLSILSLIGIFNRSFRTGIKRR------------------- 387
                        .. .  . * . .

huIL-12R 2  435 DNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPG-GDTQVPLNWLRSRPYNVSA 483
hugp130     437 NMLWVEWTTPRE---SVKKYILEWCVLS---DKAPCITDWQQEDGTVHRT 480
huDCRS5     388 ---------------ILLLIPKWLYEDIPNMKNSNVVKMLQEN----SE 417
                          .  .  *                .
```

14.01.03

```
huIL-12R 2 484 LISENIKSYICYEIRVYALSGDQ-GGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITE 532
hugp130    481 YLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKV 530
huDCRS5    418 LMNNNSSE--------QVLYVDP-----MITEIKEIFIPEHKPTDYKKE- 453
                 .  *           .  *       *        *    *

huIL-12R 2 533 EKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNS 582
hugp130    531 GKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGN----ETAVNVDSSHTE 576
huDCRS5    454 --NTGPLETRDYP---QNSLFDNTTVVYIPDLNTG------YKPQISN-- 490
                   .   .     *   *     .  .       .              *

huIL-12R 2 583 HPINSLQPRVTYYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLQGKAN-WMAFVAPSI 631
hugp130    577 YTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEG-GKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPV 625
huDCRS5    491 ------------------FLPEG-------------------------- 495
                                   *

huIL-12R 2 632 CIAIIMVGIFSTHYFQQKVFVLLAALRP-----------QWCSREIPDPA 670
hugp130    626 CLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHN 675
huDCRS5    496 -----------SHLSNNN-EITSLTLKP-------------PVDSLLSG 519
                           .   .    . *

huIL-12R 2 671 NSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLLID-WPTPEDPEPLVIS--EVLHQVTPV 717
hugp130    676 FNSKDQMYSDGNFTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHS 725
huDCRS5    520 NNPRLQKHPN-FAFSVSSVNSLSNT------------I---FLGELSLI 552
                       .          .                  .

huIL-12R 2 718 FRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLY 767
hugp130    726 SGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQ 775
huDCRS5    553 LNQGECS---S--PDIQNSVEEETTMLLENDSP----------------- 580
                    .*       *      *

huIL-12R 2 768 KVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSN---IDDLPSHEAP 814
hugp130    776 VFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSQHESS 825
huDCRS5    581 --SETIPEQTLLPDEFVSCLGIVNEELPSINTYFPQN---ILESHFNR-- 623
                       .                    .      * .        .

huIL-12R 2 815 LADSLEELEPQHISLS-----VFPSSSLHPLTFSCG-------------- 845
hugp130    826 PDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAAD 875
huDCRS5    624 --ISLLEK                                          629
                  *  *

                                                          862
huIL-12R 2 846 ----------DKLTLDQLKMRCDSLML                 918
hugp130    876 AFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ 629
huDCRS5    630
```

Nejbližší příbuzní extrabuněčné oblasti „IL-30R" jsou signální transduktor IL-6 gp130 a IL-12Rβ2. Méně blízcí příbuzní jsou receptor GCSF, receptor leptinu, receptor faktoru inhibující leukemii a receptor CNTF. Tak „IL-30R" je člen třídy I větve superrodiny receptoru cytokinů a je úzce příbuzný rodině IL-6R/Il-12R.

Tabulka 3 zobrazuje porovnání dostupných sekvencí podjednotek receptoru primátu s DCRS5(IL-30R) primáta, například člověka. DCRS5 vykazuje podobnost s podjednotkou gp130 receptoru IL-6 (například podjednotka IL-6R) a s podjednotkou IL-12Rβ2. DCRS5 vykazuje strukturální rysy podjednotky beta, ale skutečná sekvence proteinových interakcí a signalizace zůstává nevyřešena.

Termín DCRS5 se může použít k popisu proteinu, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci zobrazenou v tabulce č. 1. V mnoha případech jeho podstatný fragment bude funkční a strukturní ekvivalent vyvolávající další extracelulární segmenty. Vynález dále popisuje variace proteinu alely DCRS5, jejíž sekvence se popisuje shora v textu, například mutein nebo jiná konstrukce. V typickém případě takové variace budou vykazovat méně než přibližně 10% rozdíl sekvence ve srovnání s cílovou oblastí, takže budou často mít jednu až jedenáct substitucí, například 2, 3, 5, 7 substitucí. Zdůrazňují se také alelové a jiné varianty, například přirozený polymorfizmus, popsaného proteinu. V typickém případě se budou vázat s vysokou afinitou na odpovídající biologický ligand, možná v dimerizovaném stádiu s podjednotkou receptoru alfa, například alespoň s přibližnou koncentrací 100 nM, obvykle lépe než přibližně 30 nM, s výhodou lépe než přibližně 10 nM a ještě výhodněji lépe než přibližně 3 nM. Termín také zahrnuje příbuzné přirozeně se vyskytující formy, například alely, polymorfní varianty a metabolické varianty proteinu savce. Výhodné formy receptorových komplexů se budou vázat na vhodný

ligand s afinitou a selektivitou vhodnou pro interakci ligand-receptor.

Tento vynález dále zdůrazňuje kombinace proteinů nebo peptidů, které vykazují podstatnou identitu aminokyselinové sekvence uvedené v tabulce č. 1. Budou zahrnovat varianty sekvence s relativně malým množstvím substitucí, například s výhodou méně než přibližně 3 až 5.

Podstatný polypeptidový „fragment" nebo „segment" je pruh aminokyselinových zbytků obsahujících alespoň přibližně 8 aminokyselin, v obecném případě alespoň 10 aminokyselin, více obecně alespoň 12 aminokyselin, často alespoň 14 aminokyselin, častěji alespoň 16 aminokyselin, v typickém případě alespoň 18 aminokyselin, více typické je, když obsahují alespoň 20 aminokyselin, obvykle alespoň 22 aminokyselin, obvykleji alespoň 24 aminokyselin, výhodné je alespoň 26 aminokyselin, výhodnější je alespoň 28 aminokyselin a ve zvláště výhodném provedení vynálezu alespoň přibližně 30 nebo více aminokyselin. Sekvence segmentů různých proteinů se mohou porovnávat jeden s druhým ve vhodné délce pruhů. V mnoha situacích fragmenty mohou vykazovat funkční vlastnosti nedotčených podjednotek, například extrabuněčná oblast transmembránového receptoru si může ponechat schopnost vázat se na ligand a může se použít k přípravě rozpustného komplexu podobného receptoru.

Homologie aminokyselinové sekvence nebo shoda sekvence se stanoví optimalizací párování zbytků. Při určitém porovnání je možné začlenit mezery, je-li to nutné (popisuje se například v publikaci Needleham, et al., (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453, Sankoff et al., (1983) kapitola jedna v Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and practice of sequence comparison, Addison-Wesley, Reading, MA, použil se software IntelliGenetics, Mountain View, CA a the University

of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). To se mění, když se jako párování uvažují konzervativní substituce. Konzervativní substituce v typickém případě zahrnují substituce v následujících skupinách: glycin, alanin, valin, izoleucin, leucin, kyselina aspartová, kyselina glutamová, asparagin, glutamin, serin, threonin, lyzin, arginin a fenylalanin, tyrosin. Předpokládá se, že homologní aminokyselinové sekvence zahrnují v sekvenci cytokinu přirozené alelové a vnitrodruhové variace. Typické homologní proteiny nebo peptidy vykazují 50 až 100 % homologie (v případě, že se zavedou mezery), 60 až 100 % homologie (v případě, že budou zahrnovat konzervativní substituce), když se srovnávají se segmentem aminokyselinové sekvence uvedeného v tabulce č. 1. Míra homologie je alespoň přibližně 70 %, v obecném případě alespoň 76%, dále alespoň 81 %, často alespoň 85 %, častěji alespoň 88 %, v typickém případě alespoň 90 %, dále alespoň 92 %, obvykle alespoň 94 %, obvykleji alespoň 95 %, s výhodou alespoň 96 % a výhodněji alespoň 97 % a ve zvláště výhodných provedeních alespoň 98 % a více. Stupeň homologie bude kolísat s délkou porovnávaných segmentů. Homologní proteiny nebo peptidy, jako jsou alelové varianty, budou sdílet většinu biologických aktivit s provedením popsaným v tabulce č. 1, zvláště ve vnitrobuněčné části.

Termín „biologická aktivita" se používá k popisu účinků na signalizaci, zánětlivé odezvy, přirozené imunity a/nebo morfogenního vývoje ligandů podobných cytokinu. Tyto receptory zprostředkovávají například aktivity fosfatázy nebo fosforylázy, které se obvykle měří standardními postupy (popisuje se například v publikaci Hardie et al., (eds. 1995) The protein kinase FactBook vols. I and II, Academic Press, San Diego, CA, Hanks, et al., (1991) Meth. Enzymol. 200: 38-62, Hunter, et al., (1992) Cell 70: 375-388, Lewin (1990) Cell 61: 743-752, Pines, et al., (1991) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 56: 449-463 a Parker, et al., (1993) Nature 363:

736-738). Receptory nebo jejich části se mohou použít jako enzymy značící fosfatázou ke značení obecných nebo specifických substrátů. Podjednotky mohou také být funkčními imunogeny, aby vyvolaly protilátky nebo antigeny schopné vázat protilátky.

Termíny ligand, agonista, antagonista a analog například DCRS5 splňují rysy DCRS5 interakcí ligand-receptor, například v případě, kde receptor je přirozený receptor nebo protilátka. Buněčné odezvy jsou v typickém případě zprostředkovány cestou receptorovou tyrosinovou kinázu.

Ligand je molekula, která slouží buď jako přirozený ligand, na který se uvedený receptor nebo jeho analog váže nebo molekula, která je funkční analog přirozeného ligandu. Funkční analog může být ligand s úpravami struktury nebo to může být zcela nepříbuzná molekula s tvarem molekuly, který reaguje s vhodnými determinanty vázajícími se na ligand. Ligandy mohou sloužit jako agonisté nebo antagonisté (popisuje se například v publikaci Goodman, et al., (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, Pergamon Press, New York.

Racionální vzhled léků může být také založen na studiích struktury tvaru molekul receptoru nebo protilátky a jejich efektorů nebo ligand (popisuje se v publikaci Herz, et al., (1997) J. Recept. Signal Transduct. Res. 17: 671-776 a Chaiken, et al., (1996) Trends Biotechnol. 14: 369-375). Efektory mohou být další proteiny, které zprostředkovávají jiné funkce při odezvě na navázání ligandu nebo jiné proteiny, které v normálním případě reagují s receptorem. Jeden způsob stanovení míst reagujících s se specifickými proteiny je stanovení fyzikální struktury, například krystalografie použitím paprsků X nebo dvourozměrná NMR. Tyto metody poskytují způsob zjištění, které aminokyselinové zbytky tvoří

14.01.03

molekulové kontaktní oblasti. Detailnější popis stanovení struktury proteinu se popisuje například v publikaci Blundell and Johnson (1976) Protein Crystalography, Academic Press, New York.

II. Aktivity

Proteiny podobné receptorům cytokinů, když se přidají nebo odstraní ze specifického substrátu, mají řadu různých biologických aktivit, jako je například vnitrobuněčná signalizace například prostřednictvím STAT4, úpravou proliferace buněk nebo při metabolizmu fosforečnanů. To v obecném případě povede k úpravě zánětlivé funkce, přirozené imunitní odezvě nebo k morfologickému účinku. Podjednotka bude pravděpodobně mít specificky nízkou afinitu navázání s ligandem.

DCRS5 má charakteristické motivy signalizace receptoru prostřednictvím dráhy JAK (popisuje se v publikaci Ihle, et al., (1997) Stem Cells 15 (suppl. 1): 105-111, Silvennoinen, et al., (1997) APMIS 105: 497-509, Levy (1997) Cytokine Growth Factor Review 8: 81-90, Winston nad Hunter (1996) Current Biol. 6: 668-671, Barret (1996) Baillieres Clin. Gastroenterol. 10: 1-15 a Briscoe, et al., (1996) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351: 167-171. Středem zájmu jsou vazebné motivy SH2 popsané shora v textu.

Biologické aktivity podjednotek receptoru cytokinů souvisí s přidáním nebo odstraněním fosforečnanových částí do nebo z substrátů v typickém případě specifickým způsobem v netypickém případě nespecifickým způsobem. Substráty se mohou identifikovat nebo podmínky enzymatické aktivity se mohou testovat použitím standardních testů (popisuje se například v publikaci Hardie, et al., (eds. 1995) The protein kinase FactBook vols. I and II, Academic Press, San Diego, CA,

Hanks, et al., (1991) Meth. Enzymol. 200: 38-62, Hunter, et al., (1992) Cell 70: 375-388, Lewin (1990) Cell 61: 743-752, Pines, et al., (1991) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 56: 449-463 a Parker, et al., (1993) Nature 363: 736-738).

Podjednotky receptorů se mohou kombinovat za vzniku funkčních komplexů, které se mohou například použít při navázání ligandu nebo přípravě protilátek. Ty se mohou použít pro diagnostické účely zahrnující detekci nebo kvantifikaci. Funkční vazba receptoru s ligandem p40/IL-B30 poskytuje důležitá proniknutí do klinické indikace, že je možné použít receptor. Tak antagonisté a agonisté budou mít předpokládané funkční účinky.

III. Nukleové kyseliny

Vynález popisuje použití izolované nukleové kyseliny nebo fragmentů, které například kódují uvedené nebo úzce příbuzné proteiny nebo jejich fragmenty. Kódují například odpovídající polypeptid, s výhodou ten, který je biologicky aktivní. Navíc tento vynález popisuje izolovanou a rekombinantní DNA, která kóduje kombinace takových proteinů nebo polypeptidů, které mají charakteristické sekvence, jako je například samotný DCRS5 nebo v kombinaci s jinými, jako je podjednotka IL-12Rβ1 (popisuje se v publikaci Showe, et al. (1996) Ann. N.Y. Acad. Sci. 795: 413-425, Gately, et al., (1998) Ann. Rev. Immunol. 16: 495-521, GenBank U03187, NM_005535). V typickém případě je nukleová kyselina schopna hybridizovat za vhodných podmínek se segmentem sekvence nukleové kyseliny zobrazeným v tabulce č. 1, ale s výhodou nehybridizuje s odpovídajícími segmenty jiných receptorů zobrazenými v tabulce č. 3. Uvedený biologicky aktivní protein nebo polypeptid může být protein v plné délce nebo jeho fragment a bude v typickém případě obsahovat vysoce homologní segment aminokyselinové sekvence, který například vykazuje podstatnou shodu se segmentem

uvedeným v tabulce č. 1. Vynález dále popisuje použití izolované nebo rekombinantní nukleové kyseliny nebo jejího fragmentu, který kóduje proteiny obsahující fragmenty, které jsou ekvivalentní s proteiny DCRS5. Jako jsou například vnitrobuněčné části. Izolované nukleové kyseliny mohou mít regulační sekvence na 5´ a 3´koncích. Jsou to například promotory, zesilovače, poly-A adiční signály a jiné, které pochází z přirozeného genu. Vynález také popisuje kombinace, například kombinaci DCRS5 s IL-12Rβ1 nebo jejich extrabuněčné části vázající se na ligand, jako ligandové antagonisty. Důležitá je také možnost využití pro diagnostické účely, například polymorfní nebo jiné varianty.

Popisuje se izolovaná nukleová kyselina, například RNA, DNA nebo smíchaný polymer, který je v podstatě čistý, například separovaný od jiných komponentů, jenž přirozeně doprovází přirozenou sekvenci, jako jsou ribozomy, polymerázy a přilehlé genomové sekvence z originálních druhů. Termín zahrnuje sekvenci nukleové kyseliny, která se vyňala ze svého přirozeného prostředí a zahrnuje rekombinantní a klonované izoláty DNA, které se tím stávají odlišitelné od přirozeně se vyskytujících látek a chemicky syntetizovaných analogů nebo analogů biologicky syntetizovaných heterologními systémy. V podstatě čistá molekula zahrnuje izolované formy molekuly, buď zcela nebo částečně čisté.

Izolovaná nukleová kyselina bude v obecném případě homogenní seskupení molekul, ale v některých provedeních bude obsahovat heterogenitu přednostně minoritní. Tato heterogenita byla v typickém případě zjištěna na koncích nebo v částech polymerů a zjistilo se, že není kritická pro požadovanou funkci nebo aktivitu.

Termín „rekombinantní" nukleová kyselina se v typickém případě definuje svou metodou produkce nebo svou strukturou.

Pokud jde o způsob produkce, například produkt připravený určitým způsobem, způsob používá metodu rekombinace nukleové kyseliny, například zahrnuje lidský zásah do nukleotidové sekvence. V typickém případě tento zásah zahrnuje manipulaci in vitro, ačkoli za jistých okolností může zahrnovat klasické metody šlechtění zvířat. V jiném případě se nukleová kyselina může připravit generováním sekvence obsahující fúzi dvou fragmentů, které přirozeně na sebe nenavazují, ale to znamená, že se vyjmou přirozené produkty, například přirozeně se vyskytující mutanti, které se nacházejí ve svém přirozeném stádiu. Popisují se například produkty připravené transformací buněk pomocí vektorů, který se přirozeně nevyskytují, jako jsou nukleové kyseliny obsahující sekvenci získanou použitím libovolného způsobu syntézy oligonukleotidu. Takový způsob se často provádí, aby se nahradil například kodon redundantním kodonem, který kóduje stejnou nebo konzervativní aminokyselinu, zatímco v typickém případě zavádí nebo odstraňuje místo rozeznávané restrikčním enzymem nebo místo vhodné pro analýzu vztahu struktura - funkce. V jiném případě se použije způsob vhodný ke spojení segmentů nukleové kyseliny, které vykazují požadované funkce za vzniku jediné genetické identity obsahující požadovanou kombinaci funkcí, které nebyly nalezeny v běžně dostupných přirozených formách, například kódující fúzní protein. Místa rozeznávaná restrikčním enzymem jsou často cílem takových umělých manipulací, ale jako specifické cíle se mohou použít také jiná místa, jako jsou promotory, místa replikace DNA, regulační sekvence, řídící sekvence nebo jiné použitelné rysy. Podobný koncept je určený pro rekombinantní polypeptid, například fúzní polypeptid. Tento polypeptid bude zahrnovat dimerickou repetici nebo fúzi DCRS5 s podjednotkou IL-12Rβ1. Specificky jsou zahrnuty syntetické nukleové kyseliny, které nadbytečným genetickým kódem kódují polypeptidy ekvivalentní s fragmenty

DCRS5 a fúze sekvencí z různých odlišných příbuzných molekul, jako jsou jiní členové rodiny receptoru cytokinů.

Termín „fragment" v kontextu s nukleovou kyselinou je souvislý segment obsahujíic alespoň 17 nukleotidů, v obecném případě obsahuje alespoň 21 nukleotidů, obecněji obsahuje alespoň 25 nukleotidů, obyčejně obsahuje alespoň 30 nukleotidů nebo alespoň 35 nukleotidů, často obsahuje alespoň 39 nukleotidů, více často obsahuje alespoň 45 nukleotidů, v typickém případě obsahuje alespoň 50 nukleotidů, více typické je, když obsahuje alespoň 55 nukleotidů, obvykle obsahuje alespoň 60 nukleotidů, více obvykle je, když obsahuje alespoň 66 nukleotidů, s výhodou obsahuje alespoň 72 nukleotidů, výhodnější je, když obsahuje alespoň 79 nukleotidů a zvláště se preferovaná jsou provedení obsahující alespoň 85 nebo více nukleotidů zahrnující 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 atd. nukleotidů. V typickém případě se fragmenty různých genetických sekvencí mohou vzájemně porovnávat v celé délce vhodného pruhu sekvence, zvláště definované segmenty, jako jsou oblasti popsané dále v textu.

Nukleová kyselina, která kóduje DCRS5 bude zvláště použitelná k identifikaci genů mRNA a cDNA, které kódují samotné DCRS5 nebo blízce příbuzné proteiny, jako je DNA, která kóduje polymorfní, alelové nebo jiné genetické varianty, které například pocházejí z různých jedinců nebo příbuzných druhů. Preferované sondy, které se mohou použít při takovém testování, jsou ty oblasti receptoru, které jsou konzervativní mezi různými polymorfními variantami nebo které obsahují nukleotidy, jenž postrádají specifitu a budou se vyskytovat v plné délce nebo skoro v plné délce. V jiných situacích je lépe použít sekvence specifické pro polymorfní variantu. Mohou se také stanovit kombinace polymorfních variant DCRS5 s variantami IL-12Rβ1.

Vynález dále popisuje rekombinantní molekuly nukleové kyseliny a fragmenty, které mají sekvenci nukleové kyseliny shodnou nebo vysoce homologní s izolovanou DNA popsanou dále v textu. Sekvence budou často operativně spojené se segmenty DNA, které řídí transkripci, translaci a replikaci DNA. Tyto adiční segmenty v typickém případě asistují při expresi požadovaného segmentu nukleové kyseliny.

Homologní nebo vysoce shodné sekvence nukleové kyseliny, když se vzájemně srovnávají, například sekvence DCRS5, vykazují podstatnou podobnost. Standardy homologie v nukleových kyselinách jsou buď mírou homologie obecně užívaných v oboru porovnáním sekvence nebo jsou založeny na podmínkách hybridizace. Porovnatelné podmínky hybridizace se popisují detailněji dále v textu.

Podstatná shoda při porovnání sekvence nukleových kyselin znamená buď, že segmenty nebo jejich komplementární řetězce jsou shodné, když jsou optimálně spárovány s vhodnými nukleotidovými inzerty nebo delecemi, alespoň přibližně 60 % nukleotidů, v obecném případě alespoň 66 %, běžně alespoň 71 %, často alespoň 76 %, více často alespoň 80 %, obvykle alespoň 84 %, obvykleji alespoň 88 %, v typickém případě alespoň 93 %, více typické je alespoň přibližně 95 %, výhodné je alespoň 96 až 98 % nebo více a v určitých provedeních je shoda až 99 % nebo více. Tyto sekvence například zahrnují segmenty kódující strukturální oblasti nebo jiné popsané segmenty.

V jiném případě bude existovat podstatná shoda, když segmenty budou hybridizovat za podmínek selektivní hybridizace s řetězcem nebo jeho komplementem v typickém případě za použití sekvence získané z tabulky č. 1. V typickém případě k selektivní hybridizaci dojde, když pruh alespoň přibližně 14-ti nukleotidů vykazuje alespoň přibližně 55 % homologii,

v typickém případě alespoň přibližně 65 % homologii, výhodná je alespoň přibližně 75 % homologie a výhodnější je alespoň přibližně 90 % homologie (popisuje se v publikaci Kanehisa (1984) Nucl. Acids Res. 12: 203-213). Délka homologního porovnávání se popisuje pro delší pruhy a v jistých provedeních vynálezu budou pruhy obsahovat alespoň 17 nukleotidů, v obecném případě alespoň 20 nukleotidů, obyčejně alespoň přibližně 24 nukleotidů, obvykle alespoň přibližně 28 nukleotidů, v typickém případě alespoň přibližně 32 nukleotidů, více typické je alespoň přibližně 40 nukleotidů, výhodné je alespoň přibližně 50 nukleotidů a výhodnější je alespoň přibližně 75 až 100 nebo více nukleotidů. V tomto případě pruhy zahrnují například 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350 atd. nukleotidů a jiné délky.

Přísné podmínky hybridizace s ohledem na homologii jsou přísné kombinované podmínky koncentrace soli, teploty, organického rozpouštědla a jiných parametrů, které v typickém případě řídí hybridizační reakce. Přísné teplotní podmínky hybridizace obvykle zahrnují teploty přesahující přibližně 30 °C, obvykle přesahují přibližně 37 °C, v typickém případě přesahují přibližně 45 °C, více typické je, když přesahují teplotu okolo 55 °C, s výhodou přesahují teplotu 65 °C a výhodnější je, když přesahují teplotu okolo 70 °C. Přísné podmínky koncentrace solí budou obyčejně nižší než přibližně 500 mM, obvykle nižší než přibližně 400 mM nebo nižší než 300 mM, v typickém případě nižší než přibližně 200 mM, s výhodou nižší než přibližně 100 mM a výhodněji nižší než přibližně 80 mM, dokonce nižší než přibližně 50 nebo 20 mM. Kombinace parametrů je však daleko důležitější než míra libovolného jediného parametru (popisuje se například v publikaci Wetmur and Davidson (1986) J. Mol. Biol. 31: 349-370).

Izolovaná DNA se může snadno upravit substitucí a delecí a začleněním nukleotidů a inverzemi nukleotidových pruhů. Tyto

14.01.03

úpravy vedou ke vzniku nových sekvencí DNA, které kódují určitý protein nebo jeho deriváty. Tyto upravené sekvence se mohou použít při produkci mutantních proteinů (muteinů) nebo k zesílení exprese různých druhů. Zesílená exprese může zahrnovat amplifikaci genů, zvýšenou transkripci a translaci a jiné mechanizmy. Takový mutant DCRS5 se liší od proteinů podobných receptorům cytokinů, které se přirozeně vyskytují, aminokyselinovou sekvencí upravenou delecí, substitucí nebo inzercí. Termín „místně specifický mutant DCRS5" zahrnuje protein, který vykazuje podstatnou shodu sekvence s proteinem uvedeným v tabulce č. 1 a v typickém případě sdílí většinu biologických aktivit nebo účinků forem popsaných shora v textu. Také se definují různé přirozené polymorfní varianty sekvencí.

Ačkoli místa místně specifické mutace jsou předem stanovena, mutanti nemusí být místně specifičtí. Mutageneze savčího DCRS5 je možné dosáhnout začleněním nebo delecí aminokyselin v genu, což je spojené s expresí. Může být vytvořena substituce, delece, inzerce nebo řada kombinací, aby vznikl konečná konstrukce. Inzerce zahrnuje fúze N-konce nebo C-konce. Náhodnou mutagenezi je možné provést v cílovém kodonu a u exprimovaných mutantů savčího DCRS5 je možné testovat požadovanou aktivitu, což umožňuje nalézt vztah mezi strukturou a aktivitou. Metody přípravy substitučních mutantů v předem stanovených místech DNA, které mají známou sekvenci, jsou dobře známy v oboru, například mutageneze primerem M13 (popisuje se v publikaci Sambrook, et al., (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2d ed.) vls. 1-3, CSH Press, NY, Ausubel, et al., (1987 a periodické doplňky) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York). Zvláště použitelné konstrukce jsou extrabuněčné části DCRS5 spojené se segmenty IL-12Rβ1).

Mutace v DNA by v normálním případě neměla umístit kódující sekvence mimo čtecí rámec a je výhodné, když nevzniknou komplementární oblasti, které by mohly hybridizovat za vzniku sekundární struktury mRNA, jako jsou smyčky nebo vlásenky.

Fosforamiditová metoda popsaná v publikaci Beaucage and Carruthers (1981) Tetra. Letts. 22: 1859-1862 bude produkovat vhodné syntetické fragmenty DNA. Dvouřetězcový fragment je možné často získat buď syntézou komplementárního řetězce a teplotní hybridizací řetězce za vhodných podmínek nebo adicí komplementárního řetězce za použití DNA polymerázy s vhodnou sekvencí primeru.

Metody polymerázových řetězcových reakcí (PCR) se mohou často aplikovat při mutagenezi. V jiném případě primery pro mutagenezi jsou běžně užívanými metodami pro přípravu definovaných mutací v předem stanovaných místech (popisuje se například v publikaci Innis et al., (eds. 1990) PCR Protocols: A guide to methods and applications academic press, San Diego, CA a Dieffenbach and Dveksler (1995, eds.) PCR primer: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, CSH, NY).

Jistá provedení vynálezu popisují kombinace látek obsahujících popsanou sekvenci receptoru. V jiném provedení vynálezu funkční části sekvencí mohou být spojeny tak, aby kódovaly fúzní proteiny. V jiných formách se mohou substituovat varianty popsaných sekvencí.

IV. Proteiny, peptidy

Jak se uvádí shora v textu, vynález popisuje DCRS5 primáta, jehož sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 1, jak se také popisuje shora v textu. Vynález zahrnuje také alelové nebo jiné varianty, kterými jsou například fúzní proteiny

kombinující části takových sekvencí s jinými, které zahrnují například IL-12Rβ1, epitop tag a funkční oblasti.

Vynález také popisuje rekombinantní proteiny, jako jsou například heterogenní fúzní proteiny, které obsahují segmenty z uvedených proteinů primátů nebo hlodavců. Heterogenní fúzní protein je fúze proteinů nebo segmentů, které netvoří přirozeně fúze stejným způsobem. Fúzní produkt DCRS5 s jiným cytokinovým receptorem je spojitá molekula proteinu, která má sekvence fúzované v typické peptidové spojení, v typickém případě připravené jako jediný translační produkt a vykazující vlastnostizískané z každého zdroje peptidu. Podobný koncept se aplikuje pro sekvence heterogenních nukleových kyselin. Také se popisují kombinace různých označených proteinů za vzniku komplexů.

Navíc nové konstrukce se mohou vytvořit kombinací podobných funkčních nebo strukturálních oblastí z jiných příbuzných proteinů, jako jsou například receptory cytokinů nebo receptory podobné Toll zahrnující varianty druhů. Segmenty vázající se na ligandy nebo jiné segmenty mohou být například přesunuty mezi nové fúzní polypeptidy nebo fragmenty (popisuje se například v publikaci Cunningham, et al., (1989) Science 243: 1330-1336 a O´Dowd, et al., (1988) J. Biol. Chem. 263: 15985-15992). Pak nové chimerické polypeptidy vykazující nové kombinace specifity vzniknou z funkčního spojení specificity navázání na receptor. Oblasti vázající se na ligand z jiných příbuzných molekul se mohou přidat do jiných domén uvedeného nebo příbuzného proteinu nebo je mohou substituovat. Výsledný protein bude často míst funkci a vlastnosti hybridu. Fúzní protein může například zahrnovat oblast cílení, která může sloužit k zavedení fúzního proteinu do určité subbuněčné organely.

Kandidát fúzních partnerů a sekvencí se může vybrat z různých databází sekvencí, jako je například GenBank, c/o IntelliGenetics, Mountain View, CA a BCG, University of Wisconsin Biotechnology Computing Group? Madison, WI. Zvláště výhodné jsou kombinace polypeptidových sekvencí uvedených v tabulce č. 1 a 3. Variační formy proteinů se mohou substituovat v popsaných kombinacích.

Vynález dále popisuje muteiny, které se váží na ligandy podobné cytokinům a/nebo jejichž transdukce je ovlivněna. Strukturální uspořádání lidského DCRS5 s inými členy rodiny receptoru cytokinů ukazuje konzervativní rysy/zbytky (uvádí se v tabulce č. 3). Seskupení sekvence lidského DCRS5 s jinými členy rodiny receptoru cytokinů indikuje různé strukturální a funkčně sdílené rysy (popisuje se v publikaci Bazan et al., (1996) Nature 379: 591, Lodi, et al., (1994) Science 263: 1762-1766, Sayle and Milner-White (1995) TIBS 20: 374-376 a Gronenberg, et al., (1991) Protein Engeneering 4: 263-269).

Zvláště výhodné jsou substituce provedené s myšími sekvencemi nebo s lidskými sekvencemi. Naopak konzervativní substituce vzdálené od oblastí interakce vázající ligand budou pravděpodobně chránit většinu signalizačních aktivit a konzervativní substituce vzdálené od vnitrobuněčných oblastí budou pravděpodobně chránit většinu vlastností navázání na ligand.

Termín „deriváty" DCRS5 primáta zahrnují aminokyselinovou sekvenci mutantů, glykosylační variace, metabolické deriváty a kovalentní nebo agregační konjugáty s jinými chemickými částmi. Kovalentní deriváty se mohou připravit spojením funkčnosti se skupinami, které se nacházejí ve vedlejších aminokyselinových řetězcích nebo na jejich N-konci, například způsoby, které jsou dobře známy v oboru. Tyto deriváty mohou zahrnovat bez omezení alifatické estery nebo amidy

karboxylového konce nebo zbytky obsahující karboxylové boční řetězce, zbytky obsahující O-acylové deriváty hydroxylové skupiny a N-acylové deriváty N-terminální aminokyseliny nebo zbytky obsahující aminoskupinu, například lyzin nebo arginin. Acylové skupiny se vybraly ze skupiny alkylových částí, které zahrnují C3 až C18 normální alkyl, čímž se tvoří alkanoylaroylové druhy.

Zahrnují se také glykosylační změny, které vznikly například úpravou glykosylačních paternů polypeptidu během syntézy a zpracování nebo během dalších kroků zpracování. Zvláště výhodné způsoby provedení jsou vystavení polypeptidu glykosylačním enzymům získaným z buněk, které normálně poskytují takové zpracování, jako jsou například savčí glykosylační enzymy. Vynález také zahrnuje uvedené glykosylační enzymy. Vynález dále zahrnuje verze stejné primární aminokyselinové sekvence, která má jiné minoritní modifikace zahrnující fosforylované aminokyselinové zbytky, jako je například fosfotyrosin, fosfoserin nebo fosfothreonin.

Hlavní skupina derivátů jsou kovalentní konjugáty receptorů nebo jejich fragmentů s jinými proteiny polypeptidů. Tyto deriváty se mohou syntetizovat v rekombinantní kultuře, jako jsou N-terminální fúze nebo použitím činidel, jejich použitelnost při řetězení proteinů prostřednictvím reaktivních vedlejších skupin je dobře známa v oboru. Výhodná derivatizační místa pomocí řetězících činidel jsou ve volných aminoskupinách, v sacharidových částech a na cysteinových zbytcích.

Popisují se fúzní polypeptidy mezi receptory a jinými homologními nebo heterologními proteiny. Homologní polypeptidy mohou tvořit fúze mezi různými receptory za vzniku hybridního proteinu, který vykazuje vazebnou specifitu pro řadu různých cytokinových ligandů nebo receptor, který může mít širokou

nebo slabou specifitu substrátového účinku. Podobně se mohou zkonstruovat heterologní fúze, které budou vykazovat kombinaci vlastností nebo aktivit získaných proteinů. Typické příklady jsou fúze reportního polypeptidu, například luciferáza se segmentem nebo oblastí receptoru, jako je například segment vázající se na ligand tak, že je možné jednoduše stanovit přítomnost nebo lokaci požadovaného ligandu (popisuje se například v publikaci Dull et al., patentový dokument USA č. 4 859 609). Další fúzní partneři zahrnují glutathion-S-transferázu (GST), bakteriální β-galaktozidázu, trpE, protein A, β-laktamázu, alfa-amylázu, dehydrogenázu alkoholu a kvasinkový kopulační faktor alfa (popisuje se v publikaci Godowski, et al., (1988) Science 241: 812-816). Značené proteiny se budou často substituovat v popsaných kombinacích proteinů. Zvláště podstatná jsou spojení DCRS5 s IL-12Rβ1.

Fosforamiditový způsob popsaný v publikaci Beaucage and Carruthers (1981) Tetra, Letts. 22: 1859-1862, bude produkovat vhodné syntetické fragmenty DNA. Dvouřetězcový fragment je možné často získat buď syntézou komplementárního řetězce a teplotní hybridizací řetězců za vhodných podmínek nebo adicí komplementárního řetězce za použití DNA polymerázy s vhodnou sekvencí primeru.

Takové polypeptidy mohou také mít aminokyselinové zbytky, které mohou být chemicky upraveny fosforylací, sulfonací, biotinylací nebo adicí nebo odstraněním jiných částí zvláště těch, které mají molekulové tvary podobné fosfátovým skupinám. V některých provedeních úpravy budou použitelná značící činidla nebo budou sloužit jako cíle izolace, jako jsou například afinitní ligandy.

Fúzní proteiny budou v typickém případě vyrobeny metodou rekombinace nukleových kyselin nebo metodou syntetických polypeptidů. Metody manipulace a exprese se obecně popisují

v publikaci Sambrook, et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2d ed.), vols. 13, CSH Press NY, nebo Ausubel, et al., (1987 a periodické doplňky) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York). Metody syntézy polypeptidů se popisují například v publikaci Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2156, Merrifield (1986) Science 232: 341-347 a metoda přípravy větších polypeptidů se popisuje v publikaci Atherton, et al., (1989) Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach, IRL Press, Oxford a také Dawson, et al., (1994) Science 266: 776-779).

Tento vynález dále popisuje použití derivátů DCRS5 jiných než jsou variace v aminokyselinové sekvenci nebo glykosylace. Takové deriváty mohou zahrnovat kovalentní nebo agregativní spojení s chemickými částmi. Tyto deriváta v obecném případě spadají do tří tříd: 1) sole, 2) boční řetězec a kovalentní úprava terminálního zbytku a 3) adsorbční komplexy, například s buněčnými membránami. Takové kovalentní nebo agregativní deriváty je možné použít jako imunogeny, jako činidla v imunologických testech nebo při izolačních metodách, jako se používají při afinitním čištění receptoru nebo jiné vázající se molekule, kterou je například protilátka. Ligand cytokinu se může imobilizovat kovalentní vazbou na pevný povrch, jako je sefaróza aktivovaná kaynbromidem způsoby, které jsou dobře známy v oboru, nebo adsorbovat na polyolefinové povrchy se sesítěním s glutaraldehydem nebo bez něho za účelem použití v testu nebo při čištění receptoru cytokinu, protilátek nebo jiných podobných molekul. Ligand se může také značit detekovatelnou skupinou, jako je například značení radioaktivním jódem pomocí postupu a chloraminem T, kovalentně vázanou na řídce se vyskytující cheláty kovů alkalických zemin nebo konjugované na jiné fluorescenční části, které jsou vhodné pro použití v diagnostických testech.

Kombinace, která například zahrnuje DCRS5 podle vynálezu, se může použít jako imunogen při produkci antiséra nebo protilátek specifických pro popsané kombinace. Jsou například schopné rozlišit mezi jinými členy rodiny receptorů. Komplexy se mohou použít k testování monoklonálních protilátek nebo fragmentů vázajících antigen připravených imunizací s různými formami kontaminovaných přípravků, které obsahují protein. Termín „protilátky" také zahrnuje fragmenty přirozených protilátek vázající antigen, například Fab, Fab2, Fv atd.. Izolovaný DCRS5 semůže také použít jako činidlo pro detekci protilátek vytvořených jako odezva na zesilující expresi nebo imunologické poruchy, které vedou k produkci protilátek proti endogennímu receptoru. Navíc fragmenty DCRS5 mohou také sloužit jako imunogeny vhodné pro produkci protilátek podle vynálezu, jak se popisuje bezprostředně dále v textu. Tento vynález dále popisuje protilátky, které mají vazebnou afinitu nebo jsou řízeny proti aminokyselinovým sekvencím zobrazeným v tabulce č. 1, jejich fragmentům nebo různým homologním peptidům. Vynález dále popisuje protilátky vykazující vazebnou afinitu nebo protilátky, které vznikly proti specifickým fragmentů, které budou vystaveny povrchu externích proteinů přirozeného DCRS5. Použitelné budou také komplexy kombinací proteinů a mohou se také vytvořit protilátkové přípravky.

V jistých jiných provedeních vynálezu se rozpustné konstrukce, například segmenty DCRS5 vázající extrabuněčný ligand, s IL-12Rβ1 mohou být vazebné kompozice pro ligand a mohou se také použít jako ligandový antagonisty nebo jako antigeny k blokaci signalizace zprostředkované ligandem. Takové konstrukce se mohou použít k diagnostickým účelům například pro histologické značení ligandů nebo pro terapeutické účely například jako antagonisti ligandů.

Blokování fyziologické odezvy na ligandy receptoru může vzejít z inhibice navázání ligandu na receptor, pravděpodobně

prostřednictvím kompetitivní inhibice. Pak testy in vitro podle vynálezu budou často používat protilátky nebo segmenty těchto protilátek vázající antigen, rozpustné konstrukce receptorů nebo fragmenty spojené se substráty pevné fáze. Tyto testy také umožňují diagnostické stanovení účinků mutací nebo modifikací oblastí vázající ligand nebo jiných mutací nebo modifikací, které například ovlivňují signalizaci nebo enzymatickou funkci.

Vynález dále popisuje použití kompetitivních testů pro testování léků, kde například protilátky neutralizující receptorové komplexy nebo fragmenty soutěží s testovanou sloučeninou o navázání na ligand nebo jinou protilátku. Tímto způsobem se mohou neutralizační protilátky nebo fragmenty použít k detekci přítomnosti polypeptidu, který sdílí jedno nebo více vazebných míst vůči receptoru a také se může použít při obsazování vazebných míst na receptoru, které se může tak vázat na ligand. Konstrukce rozpustných receptorů kombinující extrabuněčné oblasti DCRS5 nebo oblasti DCRS5 vázající ligand s IL-12Rβ1 se mohou použít jako antagonisté pro kompetitivní navázání ligandu p40/IL-B30.

V. Příprava nukleových kyselin a proteinu

Dna, která kóduje protein nebo jeho fragment se může získat chemickou syntézou , testováním knihovny cDNA nebo testováním genomových knihoven připravených z mnoha buněčných linií nebo tkáňových vzorků. Přirozené sekvence se mohou izolovat použitím standardních metod a zde popsaných sekvencí (například v tabulce č. 1). Jiné doplňky druhů se mohou identifikovat hybridizací nebo různými metodami PCR kombinovanými s vyhledáváním v sekvenčních databází, jako je například GenBank.

Tato DNA se může exprimovat v různých hostitelských buňkách za účelem syntézy receptoru v plné délce nebo fragmentu, který se může naopak například použít k vytvoření polyklonálních nebo monoklonálních protilátek, ve vazebných studiích, při konstrukci a expresi oblastí vázajících ligand nebo oblastí kinázy/fosfatázy a ke studiu vztahu struktury a funkce. Varianty nebo fragmenty se mohou exprimovat v hostitelských buňkách, které se transformují a transfekují vhodnými expresívními vektory. Tyto molekuly mohou být v podstatě bez proteinu nebo buněčných kontaminant, spíše než ty získané z rekombinantního hostitele a proto je možné je použít ve farmaceutických prostředcích, kde se kombinují s farmaceuticky přijatelným nosičem a/nebo ředidlem. Protein nebo jeho části se mohou exprimovat jako fúze s jinými proteiny. Zvláště zajímavé jsou kombinace požadovaných proteinů nebo nukleových kyselin, které je kódují.

Expresívní vektory jsou v typickém případě sami se replikující konstrukce DNA nebo RNA, které obsahují požadovaný receptorový gen, jeho fragmenty nebo kombinaci genů, obvykle operativně spojených s vhodnými genetickými řídícími elementy, které je možné najít ve vhodné hostitelské buňce. Řada genů může být postupně exprimována a mohou být na polycistronickém mesagge.Specifický typ řídících elementů nezbytný k dosažení exprese bude záviset na použití hostitelské buňky. V obecném případě genetické řídící elementy mohou zahrnovat prokaryontní promotorový systém nebo eukaryontní promotorový systém řídící expresi a v typickém případě zahrnuje transkripční promotor, operátor k řízení začátku transkripce, zesilovače transkripce, které zesilují expresi mRNA, sekvenci, která kóduje místo pro navázání na ribozóm, a sekvence, které ukončují transkripci a translaci. Expresívní vektory také obvykle obsahují počátek replikace, který umožňuje replikaci vektoru nezávisle na hostitelské buňce.

Vektory podle vynálezu zahrnují ty, které obsahují DNA kódující popsanou kombinaci proteinů nebo biologicky aktivní ekvivalentní polypeptid. DNA může být řízena virovým promotorem a může kódovat selektivní marker. Vynález dále popisuje použití takových expresívních vektorů, které jsou schopny exprimovat eukaryontní cDNA kódující takové proteiny v prokaryontním nebo eukaryontním hostiteli, kde je vektor kompatibilní s hostitelem a kde eukaryontní cDNA jsou začleněny do vektoru tak, že při růstu hostitelské buňky, která obsahuje vektor, se exprimuje diskutovaná cDNA. V obvyklém případě se exprimované vektory navrhují tak, aby mohla proběhnout stabilní replikace v jejich hostitelských buňkách nebo amplifikace, která velmi zvýší celkový počet kopií požadovaných genů v buňce. Není vždy nezbytné vyžadovat, aby se expresívní vektor replikoval v hostitelské buňce. Je například možné, aby proběhla dočasná exprese proteinu nebo jeho fragmentů v různých hostitelích za použití vektorů , který neobsahují počátek replikace, který je rozeznáván hostitelskou buňkou. Je také možné použít vektory, které způsobují integraci částí kódujících protein do hostitelské DNA pomocí rekombinace.

Zde používané vektory obsahují plazmidy, viry, bakteriofág, integrovatelné fargmenty DNA a jiné excipienty, které umožňují integraci fragmentů DNA do genomu hostitele. Expresívní vektory jsou specializované vektory, které obsahují genetické kontrolní elementy, jenž ovlivňují expresi operativně spojených genů. Plazmidy jsou běžně užívaná forma vektoru, ale mohou se použít všechny jiné formy vektorů, které vykazují ekvivalentní funkci a které jsou nebo se stávají dobře známy v oboru (popisuje se například v publikaci Pouwels, et al., (1985 a doplňky) Cloning Vectors: A laboratory manual, Elsevier, N.Y., a Rodriguez, et al., (eds. 1988) Vectors: A survey of molecular clonning vectors and their uses, Buttersworth, Boston).

Transformované buňky jsou buňky, s výhodou savčí buňky, které se transformovaly nebo ttransfekovaly s vektory konstruovanými za použití metod rekombinace DNA. Transformované hostitelské buňky exprimují požadované proteiny, ale pro účely klonování, amplifikace a manipulace DNA nepotřebují exprimovat proteiny. Vynález dále popisuje kultivaci transformovaných buněk v nutričním médiu, což umožňuje akumulaci proteinu. Proteiny je možné izolovat buď z kultury nebo v jistých případech z kultivačního média.

Pro účely vynálezu jsou nukleové sekvence operativně spojeny, když jsou vzájemně funkčně příbuzné. Například DNA presekvence nebo sekreční vedoucí sekvence je operativně spojena s polypeptidem, jestliže se exprimuje jako preprotein nebo se účastní řízení polypeptidu do buněčné membrány nebo při jeho sekreci. Promotor je operativně spojen s kódující sekvencí v případě že řídí transkripci polypeptidu. Místo vázající se na ribozom je operativně spojen s kódující sekvencí, jestliže je umístěna tak, aby dovolovala translaci. V obvyklém případě operativně spojený znamená souvislý a v jednom čtecím rámci, avšak jisté genetické elementy, jako jsou represorové geny nejsou souvisle spojeny, ale stále se váží na operátorové sekvence, které naopak řídí expresi.

Vhodné hostitelské buňky zahrnují prokaryonty, nižší eukaryonty a vyšší eukaryonty. Prokaryonty zahrnují gram negativní a gram pozitivní organizmy, jako jsou například E. coli a B. subtilis. Nižší eukaryonty zahenují kvasinky, například S. cerevisiae a Pichia a druhy rodu Dictyostelium. Vyšší eukaryonty zahrnují tkáňové kultivační buněčné linie pocházející ze zvířecích buněk, které nejsou savčího původu, například hmyzí buňky a buňky ptáků a buňky savčího původu, jako jsou například lidské buňky, buňky primátů a hlodavců.

Prokaryontní hostitelské vektorové systémy zahrnují různé vektory pro řadu různých druhů. Pro účely vynálezu se v obecném případě používá mikroorganizmus E. coli a jeho vektory. Mohou se použít ekvivalentní vektory používané v případě jiných prokaryontů. Reprezentativní vektor vhodný pro amplifikaci DNA je pBR322 nebo řada jejich derivátů. Vektory, které se mohou použít k expresi receptoru nebo jeho fragmentů zahrnují, ale nejsou omezeny na takové vektory, které obsahují promotor lac (série pUC), promotor trp (pBR322 trp), promotor Ipp (série pIN), lambda pP nebo promotory pR (pOTS) nbeo hybridní promotory, jako je ptac (pDR540) (popisuje se v publikaci Brosius, et al., (1988) Expression vectors employing lambda and Ipp derived promotores, v Vectors: A survey of molecular clonning vectors and their uses (eds. Rodriguez and Denhardt), Buttersworth, Boston, Chapter 10, pp. 205 236).

Nižší eukaryonty například kvasinky a Dictyostelium se mohou transformovat vektory obsahujícími sekvenci DCRS5. Pro účely tohoto vynálezu nejběžnějším nižším eukaryontním hostitelem jsou pekařské kvasinky Saccharomyces cerevisia. Tyto kvasinky se jsou používány k reprezentaci nižších eukaryontů, ačkoli je také dostupná řada jiných kmenů a druhů. Kvasinkové vektory v typickém případě obsahují počátek replikace (vyjma integračních typů), selekční gen, promotor, DNA kódující receptor nebo jiné fragmenty a sekvence pro ukončení translace, polyadenylaci a ukončení transkripce. Vhodné expresívní vektory určené pro kvasinky zahrnují takové konstitutivní promotory jako promotory genů 3-fosfoglycerátové kinázy a různé jiné promotory genů glykolytického enzymu nebo také indukovatelné promotory, jako je promotor dehydrogenázy alkoholu nebo promotor metalothioninu. Vhodné vektory zahrnují deriváty následujících typů: samostatně se replikující s malým počtem kopií (jako jsou série Yrp), samostatně se replikující s vysokým počtem kopií (jako jsou série Yep), integrační typy

(jako jsou série Yip) nebo minichromozómy (jako jsou série YCp).

Tkáňové buněčné kultury vyšších jsou v normálním případě výhodné hostitelské buňky vhodné pro expresi funkčně aktivního interleukinu nebo receptorových proteinů. V principu je možné použít řadu buněčných linií tkáňových kultur vyšších eukaryontů, jako jsou například expresívní systémy hmyzích bakulovirů ať už pochází z bezobratlých nebo z obratlovců. Preferují se však buňky savců. Transformace nebo transfekce a pomnožení takových buněk se stává rutinním postupem. Příklady takových použitelných buněčných linií zahrnují buňky HeLa, buněčné linie vaječníků čínských křečků (CHO), buněčné linie ledvin mláďat krys (BRK), hmyzí buněčné linie, ptačí buněčné linie, buněčné linie opic (COS). Expresívní vektory vhodné pro takové buněčné linie zahrnují počátek replikace, promotor, místo počátku translace, místa sestřihu RNA (jestliže se použije pouze DNA), polyadenylační místo a místo ukončení transkripce. Tyto vektory také v obvyklém případě obsahují selektivní gen nebo amplifikační gen. Vhodnými expresívními vektory mohou být plazmidy, viry nebo retroviry, které nesou promotory získané například z takových zdrojů, jako jsou adenoviry, SV40, parvoviry, virus vakcinie nebo cytomegalovirus. Reprezentativní vzorky vhodných expresívních vektorů zahrnují pCDNA1, pCD (popisuje se v publikaci Okayama, et al., (1985) Mol. Cell Biol. 5: 1136-1142), pMC1neoPolyA (popisuje se v publikaci Thomas, et al., (1987) Cell 51: 503-512) a baculovirový vektor, jako je pAC 373 nebo pAC 610.

V případě vylučovaných proteinů a některých membránových proteinů otevřený čtecí rámec v obvyklém případě kóduje polypeptid, který obsahuje zralý nebo vylučovaný produkt kovalentně spojený s N-koncem signálního peptidu. Signální peptid se štěpí před sekrecí zralého nebo aktivního polypeptidu. Místo štěpení je možné předpovědět s vysokým

stupněm přesnosti z empirických pravidel (popisuje se například v publikaci von-Heijne (1986) Nucleic Acids Research 14: 4683-4690 a Nielsen, et al. (1997) Protein Eng. 10: 1-12) a přesné složení aminokyselin signálního peptidu se často nejeví být kritické ve spojení s jeho funkcí (popisuje se v publikaci Randall, et al., (1989) Science 243: 1156-1159, Kaiser et al., (1987) Science 235: 317. Zralé proteiny podle vynálezu se mohou často stanovit za použití standardních metod.

Často bude nutné exprimovat tyto polypeptidy v systému, který poskytuje specifický nebo definovaný glykosylační patern. V tomto případě obvyklý patern bude ten, který je poskytován přirozeně expresívním systémem. Avšak patern se bude modufikovat vystavením polypeptidu, například neglykosylované formy, vhodným glykosylačním proteinům zavedeným do heterogenního expresívního systému. Receptorový gen se může společně transformovat jedním nebo více geny, které kódují savčí nebo jiné glykosylační enzymy. Za použití uvedeného přístupu jisté savčí glykosylační paterny budou dosažitelné v prokaryontních nebo jiných buňkách. Exprese v prokaryontních buňkách v typickém případě povede k neglykosylačním formám proteinu.

Zdroj DCRS5 může být eukaryontní nebo prokaryontní hostitel exprimující rekombinantní DCRS5, jak se popisuje shora v textu. Zdrojem může být také buněčná linie, ale jiné savčí buněčné linie, které také spadají do popisu uvedeného vynálezu. Výhodná buněčná linie pochází z lidského druhu.

V případě, že sekvence jsou známy, DCRS5 primáta, fragmenty nebo jeho deriváty se mohou připravit běžnými způsoby syntézy peptidů. Tyto syntézy zahrnují způsoby syntézy popsané v publikaci Stewart and Young (1984) Solid phase peptide synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL,

Bodanszky and Bodanszky (1984) The practice of peptide synthesis, Springer Verlag, New York a Bodanszky (1984) The principles of peptide synthesis, Springer Verlag, New York. Například se může použít azidový postup, postup za použití kyselých chloridů, postup za použití kyselého anhydridu, postup použití míchaného anhydridu, způsob aktivního esteru (například p-nitrofenylester, ester N-hydroxysukcinimidu nebo ester kyanomethylu), karbodiimidazolu, oxidačně-redukční postup nebo dicyklohexylkarbodiimidový aditivní postup (DCCD). V případě shora v textu popsaných postupů je možné použít pevnou fázi a syntézu na pevné a kapalné fázi. Podobné metody lze použít s určitými sekvencemi DCRS5.

Proteiny DCRS5, fragmenty nebo deriváty je možné připravit v souladu se shora v textu popsanými postupy, které se v typickém případě používají při syntéze peptidů. V obecném případě se používají tzv. postupné způsoby, které zahrnují kondenzaci aminokyseliny s terminální aminokyselinou, přičemž v sekvenci přibývá jedna za druhou nebo připojení peptidových fragmentů k termální aminokyselinou. Aminoskupiny, které se nepoužily při párovací reakci se v typickém případě musí chránit, aby se předešlo interakci na špatném místě.

Jestliže se adoptovala syntéza na pevné fázi, C-terminální aminokyselina je vázána na nerozpustném nosiči nebo je podložena karboxylovou skupinou. Nerozpustný nosič není zvláště limitován, pokud je schopen se vázat na reaktivní karboxylovou skupinu. Příklady takových nerozpustných nosičů zahrnují halometylové pryskyřice, jako je chlorometylová nebo bromometylová pryskyřice, hydroxylmetylová, fenolová pryskyřice, terciální alkyloxykarbonylhydrazidátová pryskyřice a podobně.

Aminoskupinou chráněná aminokyselina se váže v sekvenci prostřednictvím kondenzace své aktivované karboxylové skupiny

a reaktivní aminoskupina dříve vytvořeného peptidu nebo řetězce za účelem postupné syntézy peptidu. Po syntéze kompletní sekvence se peptid oddělí od od nerozpustného nosiče za vzniku peptidu. Tento přístup syntézy na pevné fázi se popisuje v publikaci Merrifield, et al., (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156.

Připravené proteiny nebo jeho fragmenty se mohou izolovat a čistit z reakční směsi způsoby separace peptidu. Je to například extrakce, srážení, elektroforéza, různé formy chromatografie, imunoafinity a podobně. Receptory podle vynálezu se mohou získat v různých stupních čistoty v závislosti na požadovaném použití. Čistoty je možné dosáhnout použitím metod čištění proteinu, který se popisuje dále v textu, nebo použitím protilátek, které se popisují v metodách imunoabsorbční afinitní chromatografie. Tato imunoabsorbční afinitní chromatografie se provádí: nejdříve se naváží protilátky na pevný povrch a pak přijdou do kontaktu s rozpuštěným lyzátem vhodných buněk, s lyzáty jiných buněk exprimující receptor nebo s lyzáty nebo supernatanty buněk produkujících protein jako výsledek metod DNA (popisuje se dále v textu).

V obecném případě izolované proteiny budou alespoň ze 40 % čisté, běžně alespoň z 50 % čisté, obvykle alespoň z 60 % čisté, v typickém případě alespoň ze 70 % čisté, ve více typickém případě alespoň z 80 % čisté, s výhodou alespoň z 90 % čisté a výhodnější je alespoň z 95 % čisté a v určitých provedeních alespoň z 97 až 99 % čisté nebo více. Čistota je obvykle stanovena na základě hmotnosti. Je-li to vhodné aplikují se různé testy. Mohou se izolovat jednotlivé proteiny a pak se kombinují.

VI. Protilátky

Protilátky mohou vzniknout proti různým savčím proteinům DCRS5 a jejich fragmentům, které se přirozeně vyskytují v nativní formách a v jejich rekombinantních formách. Rozdíl je, že protilátky vůči aktivnímu receptoru jsou rozeznávány epitopy přítomnými v přirozených konformacích. Dále se popisují protilátky rozeznávající epitopy prezentovány kombinací DCRS5 s IL-12Rβ1. Detekce denaturovaného antigenu je také použitlná například ve westernové analýze. Také se popisují anti-idiotypické protilátky, které budou použitelné jako agonisté nebo antagonisté přirozeného receptoru nebo protilátky.

Protilátky, zahrnující vazebné fragmenty a verze jediného řetězce, proti předem definovaným fragmentům proteinu mohou vzniknout imunizací zvířat konjugáty fragmentů s imunogeními proteiny. Monoklonální protilátky jsou připravené z buněk vylučující požadované protilátky. U těchto protilátek se může testovat jejich schopnost vázat se na normální nebo defektní protein nebo agonistická nebo antagonistická aktivita. Tyto monoklonální protilátky se budou obvykle vázat s hodnotou konstanty KD přibližně 1 mM, více obvyklá je přibližná hodnota 300 μM, v typickém případě je přibližná hodnota alespoň 100 μM, ve více typickém případě je tato hodnota konstanty alespoň přibližně 30 μM. Přednostně je hodnota konstanty KD alespoň 10 μM a více se preferuje hodnota konstanty alespoň přibližně 3 μM nebo lepší.

Protilátky zahrnující fragmenty vázající antigen podle vynálezu mohou mít podstatnou diagnostickou nebo terapeutickou hodnotu. Mohou být potencionální antagonisté, které se vážou na receptor a inhibují navázání na ligand nebo inhibují schopnost receptoru vyvolávat biologickou odezvu například působit na jeho substrát. Protilátky se mohou také použít jako protilátky, které nemají neutralizační vlastnosti a mohou se

spojovat s toxiny nebo radionuklidy, aby se vázaly na produkující buňky nebo buňky lokalizované na zdroji interleukinu. Tyto protilátky se mohou dále konjugovat s léky nebo jinými terapeutickými činidly buď přímo nebo nepřímo pomocí linkeru.

Protilátky podle vynálezu se mohou také použít při diagnostických aplikacích. Jako záchytné nebo neneutralizační protilátky se mohou vázat na receptor bez inhibujících ligandů nebo navázání substrátu. Neutralizační protilátky se mohou použít v kompetitivním vazebném testu. Budou se také moci použít při detekci nebo kvantifikaci ligand. Mohou se také použít jako činidla při analýze westernovým přenosem nebo při imunologickém srážení nebo imunologickém čištění proteinu. Podobně se mohou na pevných substrátech nebo plastových listech imobilizovat nukleové kyseliny a proteiny. Substráty mohou být například částice z pevné pryskyřice nebo listy plastu.

Fragmenty proteinů se mohou vázat na jiné materiály, zvláště peptidy, jako fúzované nebo kovalentně vázané polypeptidy, aby se mohly použít jako imunogeny. Savčí receptory cytokinů a fragmentů se mohou fúzovat nebo kovalentně vázat na různé imunogeny, jako je hemocyanin přílipkovitých plžů, albumin bovinního séra, toxoid tetanu (popisuje se v publikaci Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969, Landsteiner (1962) Specifity of serological reactions, Dover Publications, New York a Wiliams, et al., (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 1, Academic Press, New York), kde se také popisují metody přípravy polyklonálního antiséra. Typická metoda zahrnuje hyperimunizaci zvířete s antigenem. Krátce po opakované imunizaci se shromáždí krev zvířete a izoluje se gamaglobulin.

V některých případech je nutné připravit monoklonální protilátky z různých savčích hostitelů, jako je myš, hlodavci, primáti, lidé atd. Popis metod vhodných pro přípravu takových monoklonálních protilátek se nachází například v publikaci Stites, et al., (eds.) Basic and Clinical Immunology (4 th. ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and practice (2d ed.) Academic Press, New York a zvláště v publikaci Kohler and Milstein (1975) in Nature 256: 495-497, kde se popisuje metoda generující monoklonální protilátky. Tato metoda zahrnuje zavedení imunogenu do zvířete injekcí. Zvíře se pak usmrtí a ze sleziny se odeberou buňky , které se pak fúzují s buňkami myelomu. Výsledek je hybridní buňka nebo „hybridom", který je schopný se reprodukovat in vitro. Pak se testuje populace hybridomů za účelem izolovat jednotlivé klony, kdy každý z nich vylučuje jediný druh protilátek proti imunogenu. Tímto způsobem získané jednotlivé druhy protilátek jsou produkty imortalizovaných a klonovaných buněk B imunizovaného zvířete vytvořených jako odezva na specifické místo rozeznávané na imunogenní substanci.

Jiné vhodné metody zahrnují vystavení lymfocytů in vitro vůči antigenním polypeptidům nebo v jiném případě k selekci knihoven protilátek ve fágu nebo v podobných vektorech (popisuje se v publikaci Huse, et al., (1989) Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage Lambda, Scinece 246: 1275-1281 a Ward, et al., (1989) Nature 341: 544-546). Polypeptidy a protilátky podle vynálezu se mohou použít s úpravami nebo bez úprav, které zahrnují chimérové nebo humanizované protilátky. Polypeptidy a protilátky budou často značeny kovalentním nebo nekovalentním připojením látky, která poskytuje detekovatelný signál. Je známo široké rozmezí značících a konjugačních metod a jsou publikovány ve vědecké a patentové literatuře. K vhodnému

značení se používají radionukleotidy, enzymy, substráty, kofaktory, inhibitory, fluorescenční části, chemiluminiscenční části, magnetické částice a podobně. Použití takových značek se popisuje v patentové literatuře zahrnující US patent č. 3 817 837, 3 850 752, 3 939 350, 3 996 345, 4 277 437, 4 275 149 a 4 366 241. Mohou se také produkovat rekombinantní nebo chimerické imunoglobuliny (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 4 816 567) nebo imunoglobuliny připravené v transgenní myši (popisuje se v publikaci Mendez, et al., (1997) Nature Genetics 15 : 146-156).

Protilátky podle vynálezu mohou být použity při afinitní chromatografii při izolaci proteinů DCRS5 nebo peptidů. Mohou se připravovat kolony, kde protilátky jsou spojeny s pevným povrchem, například s částicemi jako je agaróza, Sephadex nebo podobně, kde buněčný lyzát může procházet kolonou. Kolona se promyje a pak následuje zvýšení koncentrací slabého denaturačního činidla, čímž se uvolní izolovaný protein. V jiném případě se protein může použít při čištění protilátek. Mohou se aplikovat vhodné zkřížené absorbance nebo deplece.

Protilátky se mohou také použít k testování expresívních knihoven za účelem získání jistých expresívních produktů. Obvykle protilátky užívané při takovém postupu budou značeny značkou umožňující jednoduchou detekci antigenu navázanou protilátkou.

Protilátky vytvořené proti cytokinovému receptoru se budou také moci použít k vytvoření anti-idiotypických protilátek. Tyto protilátky bude možné použít při detekci nebo diagnostice různých imunologických podmínek vztažených k expresi proteinu nebo buněk, které exprimují uvedený protein. Uvedené buňky se mohou také použít jako agonisté nebo antagonisté ligandu, který může být kompetitivním inhibitorem receptoru nebo substituentem přirozeně se vyskytujících ligand. Jisté

protilátky proti podjednotkám receptoru nebo kombinacím mohou sloužit jako aktivační protilátky, které mohou působit signalizaci, čímž slouží například jako agonisté ligandu.

Protein receptoru cytokinu, který se specificky váže nebo je specificky imunoreaktivní s protilátkou vytvořenou proti definovanému imunogenu, jako je imunogen obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 2, je v typickém případě stanoven pomocí imunologického testu. Imunologický test v typickém případě používá polyklonální antisérum, které se vytvořilo například proti proteinu se sekvencí SEQ ID NO: 2. Toto antisérum se vybralo tak, aby vykazovalo nízkou zkříženou reaktivitu s jinými členy rodiny cytokinových receptorů, jako je například podjednotka receptoru IL-12Rβ2 nebo podjednotka gp130 receptoru IL-6, s výhodou ze stejných druhů a libovolná taková zkřížená reaktivita je před použitím v imunologickém testu odstraněna imunoabsorpcí.

Za účelem produkovat antisérum vhodné pro použití v imunologickém testu, se izoluje protein například se sekvencí SEQ ID NO: 2. Rekombinantní protein se může například produkovat v savčí buněčné linii. Vhodný hostitel například imbrední kmen myši, jako je Balb/c je imunizován vybraným proteinem, v typickém případě se používá standardní adjuvans, jako je Freundovo adjuvans, a standardní imunizační protokol pro myši (popisuje se v publikaci Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and practice (2d ed.) Academic Press, New York). V jiném případě se jako imunogen může použít syntetický peptid získaný ze zde popsaných sekvencí a je konjugován s nosičovým proteinem. Shromáždila se polyklonální antiséra a titrovala se proti imunogennímu proteinu v imunologickém testu. Použil se například imunologický test a imunogenem imobilizovaným na pevném povrchu. Polyklonální antisérum s titrem 10^4 nebo vyšší se

14.01.03

vybralo a testovalo za účelem zjištění jeho zkřížené reaktivity proti členům rodiny cytokinových recepotrů, jako je například gp130 nebo IL-12Rβ1 za použití kompetitivního vazebného imunologického testu, jak se popisuje v publikaci Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and practice (2d ed.) Academic Press, New York na stránkách 570-573). Při tomto stanovení se používají s výhodou dva členové rodiny cytokinových receptorů. Tyto členové rodiny cytokinových receptorů se mohou produkovat jako rekombinantní proteiny a izolovaly se za použití standardní molekulové biologie a popsaných metod chemie proteinů.

Imunologické testy v kompetitivním vazebném formátu se mohou použít při stanovení zkřížené reaktivity. Protein se sekvencí SEQ ID NO: 2 se může imobilizovat na pevný podklad. Proteiny přidané do testu mohou soutěžit s navázáním antisera s imobilizovaným antigenem. Schopnost shora popsaných proteinů soutěžit v navázání antiséra na imobilizovaný protein se porovnává s proteiny, jako je například gp130 nebo IL-12Rβ2. Procento zkřížené reaktivity shora uvedených proteinů se vypočítala za použití standardního výpočtu. Vybrala se a shromáždila se antiséra se zkříženou reaktivitou nižší než 10 % pro každý protein uvedený shora v textu. Zkříženě reagující protilátky se pak odstraní ze shromážděného antiséra imunologickou absorpcí se shora uvedenými proteiny.

Imunologicky absorbovaná a shromážděná antiséra se pak použily v kompetitivním vazebném imunologickém testu, jak se popisuje shora v textu, aby se porovnal druhý protein s imunogenním proteinem (například protein podobný DCRS5 se sekvencí SEQ ID NO: 2). Za účelem uskutečnit toto porovnání, se testoval každý ze dvou proteinů v širokém rozmezí koncentrací a stanovilo se množství každého proteinu nutné k inhibici 50 % navázání antiséra na imobilizovaný protein.

14.01.03

Jestliže nutné množství druhého proteinu je nižší než dvojnásobek množství vybraného proteinu nebo proteinu, který je nutný, pak se dá říci, že druhý protein se specificky váže na protilátku vytvořenou proti imunogenu.

Rozumí se, že tyto proteiny receptoru cytokinů jsou členové rodiny homologních proteinů, které obsahují řadu identifikovaných genů. V případě určitého genového produktu, jako je DCRS5, termín neznamená pouze zde popsané aminokyselinové sekvence, ale také jiné proteiny, které jsou alelické, nealelické nebo druhové varianty. Rozumí se, že termíny zahrnují nepřirozené mutace zavedené záměrnou mutací za použití běžné rekombinantní technologie, jako jsou mutace v jedné poloze nebo vystřiženým krátkých sekcí DNA kódující proteiny nebo substitucí nových aminokyselin nebo přidáním nových aminokyselin. Takové minoritní změny v typickém případě v podstatě udržovat imunologickou shodu původní molekuly a/nebo svou biologickou aktivitu. Tak tyto změny zahrnují proteiny, které jsou specificky imunoreaktivní s označenými přirozeně se vyskytujícím proteinem DCRS5. Biologické vlastnosti změněných proteinů se mohu stanovit expresí proteinu ve vhodné buněčné linii a měřením vhodného účinku například na transfekovaných lymfocytech. Určité minoritní úpravy proteinu zahrnují konzervativní substituci aminokyselin s podobnými chemickými vlastnostmi, jak se popisuje shora v textu v případě rodiny cytokinových receptorů jako celku. Srovnáním proteinu s proteinem cytokinových receptorů a použitím běžných zde popsaných imunologických testů za účelem stanovení imunologické shody je možné stanovit složení proteinu podle vynálezu.

Protilátky vytvořené proti podjednotkám receptoru mohou sloužit k prostorovému zablokování navázání ligandu na funkční receptor. Takové protilátky se mohou vytvořit buď proti

samotné podjednotce nebo proti kombinaci DCRS5 s IL-12Rβ1. Výsledkem by měly být antagonisté protilátek.

VII. Sady, diagnózy a kvantifikace

V sadách a v testech podle vynálezu je možné použít přirozeně se vyskytující a rekombinantní formy molekul podobných receptoru cytokinů popsaných shora v textu. Tyto metody se mohou také aplikovat při testování vazebné aktivity, například ligandů, v případě uvedených proteinů. V současné době se vyvinulo několik metod automatického testování, které umožňují testování desetitisíců sloučenin v jednom roce (popisuje se v publikaci BIOMEK automated workstation, Beckman Instruments, Palo Alto, California a Fodor, et al., (1991) Science 251: 767-773). Později se popisují způsoby testování vazebných schopností velkého množství definovaných polymerů syntetizovaných na pevném substrátu. Vývoj vhodných testů k tetsování ligandů nebo agonistických/antagonistických homologních proteinů je umožněn schopností izolovat velké množství izolovaných, rozpustných cytokinových receptorů v aktivním stádiu.

Při testování shora popsaných ligandů je možné izolovaný DCRS5 vázat přímo na destičky. Avšak protilátky, které nemají neutralizační účinek vůči uvedeným proteinům, se mohou použít jako záchytné protilátky k imobilizaci receptoru na pevné fázi, což se dá využít pro diagnostické účely.

Vynález dále popisuje použití DCRS5, jeho fragmentů, peptidů a jejich fúzních produktů v různých diagnostických sadách a metodách při detekci přítomnosti proteinu nebo jeho ligandu. V jiném případě nebo navíc protilátky proti molekulám mohou být začleněny do sad a mohou se použít při různých metodách. V typickém případě sada bude mít nádobku obsahující buď peptid DCRS5 nebo segment genu nebo činidlo, které

rozeznává peptid nebo genový segment. V typickém případě rozeznávací činidlo v případě peptidu bude receptorem nebo protilátkou nebo v případě genového segmentu by jím obvykle mohla být hybridizační sonda. Jiné složky sady mohou zahrnovat jiné proteiny nebo činidla příbuzná s polypeptidy p40, IL-B30 nebo IL-12Rβ1 párování ligand/receptor.

Výhodná sada pro stanovení koncentrace DCRS5 ve vzorku bude v typickém případě obsahovat značenou sloučeninu, například ligand nebo protlátku, která vykazuje známou vazebnou afinitu pro DCRS5, zdroj DCRS5 (přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní) jako pozitivní kontrolu a prostředky pro separaci navázaných sloučenin od volných nevázaných sloučenin, což je například pevná fáze pro imobilizaci DCRS5 v testovaném vzorku. V normálním případě sada obsahuje nádobky obsahující činidla a instrukce. Také jsou připraveny sady obsahující vhodnou nukleovou kyselinu nebo protein.

Protilátky zahrnující fragmenty vázající antigen specifické pro savčí DCRS5 nebo peptidový fragment nebo fragmenty receptoru jsou použitelné při diagnostických aplikacích za účelem detekce přítomnosti zvýšeného množství ligandu a/nebo jeho fragmentů. Diagnostické testy mohou být homogenní (bez kroku separace mezi volným činidlem a komplexem protilátka-antigen) nebo heterogenní (s krokem separace). Existují různé běžné testy, jako je radioimunologický test (RIA), test ELISA, enzymatický imunologický test (EIA), test EMIT, substrátový imunologický test za použití fluorescenčního značení (SLFIA) a podobně. Neznačené protilátky mohou být použity jako sekundární protilátky, které jsou značeny a které rozeznávají protilátky vůči receptoru cytokinu nebo k jeho určitému fragmentu. Tyto testy se také velmi diskutují ve vědecké literatuře (popisuje se například v publikaci Harlow and Lane (1988) Antibodies: A laboratory manual, CSH a Coligan

(ed. 1991 and periodic supplements) Current protocols in immunology greene/Wiley, New York).

Anti-idiotypické protilátky mohou mít podobné použití. Mohou sloužit jako agonisté nebo antagonisté receptorů cytokinů. Mohou se také použít za vhodných okolností jako terapeutická činidla.

Činidla pro diagnostické testy jsou často dodávány přímo v sadách, aby se optimalizovala citlivost testu. Předmětem vynálezu v závislosti na podstatě testu je také protokol a značící činidlo, značené nebo neznačené protilátky nebo značený ligand. To je obvykle v kombinaci s jinými aditivy, jako jsou pufry, stabilizátory, materiály nezbytné pro produkci signálu, jako jsou substráty pro enzymy a podobně. Sada bude s výhodou obsahovat instrukce pro použití a likvidaci činidel po použití. V typickém případě sada obsahuje nádoby pro každé použitelné činidlo a bude obsahovat instrukce pro vhodné použití a likvidaci činidel. Je-li to nutné činidla se budou vyskytovat jako suchý lyofilizovaný prášek, přičemž se činidla dají uvést do vodného média a tak dosáhnout správné koncentrace pro uskutečnění testu.

Shora v textu uvedené konstituenty diagnostických testů se mohou použít bez úpravy nebo se mohou upravovat různými způsoby. Například značení se může provést kovalentním nebo nekovalentním spojením části, která přímo nebo nepřímo poskytuje detekovatelný signál. V řadě uvedených testů testovaná sloučenina, receptor cytokinu nebo jejich protilátky se mohou značit buď přímo nebo nepřímo. Možnosti přímého značení zahrnují značící skupiny: radioaktivní značení, jako je ^{125}I, enzymy (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 3 645 090), jako je peroxidáza a alkalická fosfatáza a fluorescenční značky (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 3 940 475) schopné monitorovat změny intenzity

fluorescence, posun vlnové délky nebo polarizaci fluorescence. Pravděpodobnost nepřímého značení zahrnuje značení jedné složky biotinem, pak následuje navázání na avidin, který je spojený s jednou ze shora popsaných skupin.

Existuje řada metod separace navázaného ligandu od volného ligandu nebo v jiném případě navázané sloučeniny od volné testované sloučeniny. Cytokinový receptor se může imobilizovat na různých matricích, po kterých následuje promytí. Vhodné matrice zahrnují plasty, jako jsou destičky vhodné pro test ELISA, filtry a částice. Metody imobilizující receptor na matrici zahrnují přímou adhezi na plast, použití záchytových protilátek, chemické spojování a biotin avidin. Poslední krok uvedeného přístupu zahrnuje srážení komplexu protilátka/antigen libovolnou z několika metod zahrnující tu, která používá například organické rozpouštědlo, jako je polyetylenglykol nebo sůl, jako je sulfát amonný. Jiné vhodné separační postupy zahrnují bez omezení metodu používající magnezivotelné částice fluoresceinem značených protilátek, jak se popisuje v publikaci Rattle et al., (1984) Clin. Chem. 30(9): 1457-1461 a dvojitou protilátkovou separaci za použití magnetických částic (popisuje se v patentovém dokumentu USA č. 4 659 678).

Popisují se způsoby pro navázání proteinu nebo fragmentů na různé značky, které se dostatečně popisují v literatuře a nevyžadují další diskuzy. Řada technik pro vznik vazby používá aktivovaných karboxylových skupin buď použitím karbodiimidu nebo aktivních esterů za vzniku peptidových vazeb, vytvoření thioeterů reakcí merkaptoskupiny s aktivovaným halogenem, jako je chloroacetyl nebo aktivovaný olefin, jako je maleimid. Podle vynálezu se může také použít metoda fúze proteinů.

Jiný diagnostický přístup podle vynálezu zahrnuje použití oligonukleotidové nebo polynukleotidových sekvencí získaných

ze sekvence cytokinového receptoru. Tyto sekvence se mohou použít jako sondy pro detekci cytokinového receptoru u pacientů, u kterých se předpokládají imunologické poruchy. V literatuře se popisuje a diskutuje příprava nukleotidových sekvencí RNA a DNA, značení sekvencí a výhodné místo sekvencí. V normálním případě oligonukleotidová sonda by měla mít alespoň 14 nukleotidů, obvykle alespoň přibližně 18 nukleotidů a polynukleotidové sondy mohou být velikosti až několik kilobází. Mohou se použít různá značení, nejběžnější jsou radionukleotidy, zvláště ^{32}P. Pro zavedení do polynukleotidů se mohou také použít nukleotidy upravené použitím biotinu. Biotin pak slouží jako místo pro navázání na avidin nebo protilátky, které se mohou značit rozmanitými druhy značících činidel, jako jsou radionukleotidy, fluorescenční činidla, enzymy nebo podobně. V jiném případě se mohou použít protilátky, které mohou rozpoznávat specifické duplexy, které zahrnují duplexy DNA a RNA, DNA a RNA hybridní duplexy nebo duplexy DNA a protein. Protilátky naopak mohou být značeny a testovány za účelem zjištění, kde je na povrchu vázán duplex tak, že na základě vytvoření duplexu na povrchu, je možné detekovat přítomnost protilátek na povrchu duplexu. Použití sond vůči nové antimediátorové RNA se může provést běžnými technikami, jako je hybridizace nukleových kyselin, testování plus a mínus, testování rekombinantními sondami, translace za uvolnění hybridů (HRT) a translace blokovaná hybridem (HART). Tyto techniky také zahrnují amplifikační metody, jako je polymerázová řetězcová reakce (PCR).

Vynález popisuje diagnostické sady, které se používají k testování přítomnosti kvalitativní nebo kvantitativní přítomnosti jiných markerů. Diagnóza a prognóza může záviset na kombinaci značících činidel (popisuje se v publikaci Viallet et al., (1989) Progress in growth factor res. 1: 89-97). Detekce polymorfních variant, které mohou odrážet rozdíly signalizace funkčního receptoru se mohou použít při stanovení

terapeutické strategie. Variace, které odráží větší nebo menší odezvu na ligand umožňují vybrání pacientů, kteří vykazují nebo nevykazují odezvu.

VIII. Terapeutické využití

Vynález popisuje činidla s podstatnou terapeutickou hodnotou (popisuje se v publikaci Levitzki (1996) Curr. Opin. Cell Biol. 8: 239-244). Cytokinové receptory (přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní), jejich fragmenty, receptory muteinu a protilátky spolu se sloučeninami, u nichž se ukázalo, že mají vazebnou afinitu vůči receptorům nebo protilátkám, by se měly použít při léčbě stavů, které vykazují abnormální expresi receptorů nebo jejich ligandů. Taková abnormalita se v typickém případě projevuje imunologickými poruchami (popisuje se v publikaci WO 01/18051). Vynález navíc uvádí terapeutickou hodnotu při různých onemocněních spojených s abnormální expresí nebo spouštěním odezvy vůči ligandu. Naznačuje se, že například ligand p40/IL B30 se podílí na vývoji imunity zprostředkované buňkou, například protinádorové aktivity, vyvolání humorální a buněčné imunity a antivirových účinků. Ukazuje se, že ligand aktivuje buňky NK a T. Terapie může být kombinována s IL-18, IL-12, TNF, IFNγ, radiaci/chemoterapií, adjuvans nebo antinádorovými, antivirovými nebo antifungicidními látkami.

V opačném případě antagonisté, které se mohou kombinovat s antagonisty TNF, IFNγ, IL-18 nebo IL-12 nebo s IL-10 nebo steroidy mohou být indikovány u chronických onemocněních zrpostředkovanými Th1, u autoimunity nebo při transplantaci nebo/a odmítnutí transplantátu, při roztroušené skleróze, lupénce, chronických zánětlivých stavech, revmatické artritidě, osteoartritidě nebo zánětlivém onemocnění střev. Antagonisté mohou mít formu protilátek proti podjednotkám

receptoru, konstrukcím rozpustného receptoru nebo antisense nukleovým kyselinám vůči jedné nebo více podjednotek receptorů. Párování ligandu p40/IL-B30 s podjednotkami receptoru DCRS5 a IL-12Rβ1 umožňuje proniknutí do použití agonistů a antagonistů.

Při terapii je možné na základě popsaných aktivit p40/IL-B30 ovlivnit antagonisty cytokinů, například pomocí rozpustného DCRS5 za přítomnosti rozpustného IL-12Rβ1 nebo bez jeho přítomnosti nebo pomocí protilátek vůči jejich podjednotce receptoru. Antagonisté se mohou použít jako inhibitory nežádoucí imunitní nebo zánětlivé odezvy, k cílení paměti buněk T nebo v kombinaci s antagonisty IL-12/IL-12R nebo s jinými protizánětlivými činidly nebo imunosupresory. Klinické indikace mohou být chronické zánětlivé nebo transplantační stavy. Různé polymorfizmy mohou zesílit nebo zeslabit funkci receptoru a jestli jsou dominantní, mohou se použít jako terapeutická činidla. Identifikace takových variant umožňuje určit pacienty vykazující nebo nevykazujících odezvu. Činidla se mohou použít jako detekční nebo značící činidla nebo ablační činidla pro paměť buněk T a/nebo NK.

Genová terapie může poskytovat požadovanou odezvu buněčných populací vůči ligandu p40/IL-B30, jako je například adjuvans pro nádorovou imunoterapii, které umožňuje aktivaci lymfocytů, buněk T nebo NK infiltrujících se do nádoru. Antisense strategie se může aplikovat například za účelem prevence citlivosti receptoru.

U buněčných typů, které vykazují testem northernova přenosu produkci mRNA IL-12 p40 a/nebo IL-B30, jsou známy různé abnormální stavy (popisuje se v publikaci Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck and Co., Rahway, N.J., Thorn, et al., Harrison´s principles of internal medicine, McGraw-Hill, N.Y. a Weatherall, et al., (eds.)

Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, Oxford. Řada jiných zdravotních stavů a onemocnění bude vykazovat na léčbu zde popsaného agonisty nebo antagonisty (popisuje se v publikaci Stites and Terr (eds. 1991) Basic and Clinical Immunology Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut, a Samter, et al., (eds.) Immunological Diseases Little, Brown and Co.). Jiné pravděpodobné indikace léčby zahrnují přeměnu kostí, sexuální dysfunkci, prevenci neurodegenerativního onemocnění, demenci, stres a jiná onemocnění. Tyto problémy by měly být citlivé vůči prevenci nebo léčbě za použití zde popsaných sloučenin.

Mohou se izolovat rekombinantní cytokinové receptory, muteiny, agonistické nebo antagonistické protilátky nebo protilátky, které se pak aplikují pacientovi. Tato činidla se mohou kombinovat pro terapeutické účely s dalšími aktivními činidly například v přijatelných nosičích nebo ředidlech spolu s fyziologicky neškodnými stabilizátory a ekcipienty. Tyto kombinace mohou být sterilní (sterilizuje se například filtrací) a mohou tvořit dávkové formy například lyofilyzáty v kompartmentech nebo stabilizované vodné přípravky. Vynález dále také popisuje použití protilátek nebo jejich vazebných fragmentů, které se naváží na komplement.

Testování ligandů za použití receptoru cytokinu nebo jeho fragmentu se může uskutečnit za účelem identifikovat molekuly vykazující vazebnou afinitu vůči receptorům. Následné biologické testy se mohou pak použít ke stanovení, zda putativní ligand může poskytnout kompetitivní navázání, které může blokovat skutečnou stimulující aktivitu. Fragmenty receptorů se mohou použít jako blokační činidla nebo jako antagonisté, přičemž blokují aktivitu ligandu. Sloučenina vykazující intrinsickou stimulující aktivitu může aktivovat receptor a je tak antagonistou tím, že stimuluje aktivitu ligandu, který například indukuje signál. Vynález dále

popisuje terapeutické použití protilátek proti receptorům cytokinu jako antagonistů.

Množství činidel nezbytných pro účinnou terapii bude záviset na řadě různých faktorů, které zahrnují způsoby aplikace, cílové místo, fyziologickou životnost činidla, farmaceutickou životnost činidla, fyziologický stav pacienta a jiné aplikované léčiva. Léčebné dávky by se měly titrovat za účelem optimalizace bezpečnosti a účinnosti. V typickém případě dávky užívané in vitro mohou být nápomocné při stanovení množství uvedených činidel použitelných při aplikaci in situ. Testování dávek účinných pro léčbu určitých poruch na zvířatech poskytne další pomoc při stanovení lidské dávky. Různé možnosti se popisují v publikaci Gilman, et al., (eds. 1990) Goodman and Gilman´s: The pharmacological bases of therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press, a Remington´s Pharmaceutical Sciences, 17 th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn). Diskutují se zde metody aplikace. Jsou to například orální, intravenózní, intraperitoneální nebo intramuskulární aplikace, transdermální difúze a jiné. Farmaceuticky přijatelné nosiče budou zahrnovat vodu, fyziologický roztok, pufry a jiné sloučeniny popsané například v publikaci Merck Index, Merck and Co., Rahway, New Jersey. Vzhledem k pravděpodobné vysoké afinitě navázání nebo číslu přeměny mezi putativním ligandem a jeho receptory, se očekává, že na počátku bude účinná nízká dávka uvedených činidel. Signalizační dráha naznačuje, že může být účinné extrémně malé množství ligandu. Očekává se, že rozmezí dávky je množství nižší než 1mM koncentrace, v typickém případě nižší než přibližně koncentrace 10 mM, obvykle nižší než přibližně 100 nM, s výhodou nižší než přibližně 10 pM a nejvýhodnější je množství nižší než koncentrace 1 fM (fentomolární) s vhodným nosičem. V případě kontinuální aplikace se často používají prostředky nebo přístroj umožňující pomalé uvolňování.

Receptory cytokinů, jejich fragmenty a protilátky nebo jejich fragmenty, antagonosté a agonisté se mohou aplikovat přímo hostiteli, který se bude léčit, nebo v závislosti na velikosti sloučenin může být nutné konjugovat před aplikací molekuly s nosičovými proteiny, jako je ovalbumin nebo sérový albumin. Terapeutické prostředky se mohou aplikovat v řadě běžných dávkových formách. Zatímco je možné aplikovat samotnou aktivní složku, je výhodné ji prezentovat jako farmaceutický prostředek. Prostředky obsahují alespoň jednu aktivní složku, jak se definuje shora v textu, spolu s jedním nebo více přijatelnými nosiči. Každý nosič může být jak farmaceuticky tak fyziologicky přijatelný v tom smyslu, že je kompatibilní s dalšími složkami a není škodlivý pro pacienta. Prostředky zahrnují ty určené pro orální, rektální, nasální nebo parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravenózní a intradermální) aplikaci. Prostředky se mohou běžně vyskytovat v jednotkové dávce a mohou se připravovat metodami známými v oboru farmacie (popisuje se například v publikaci Gilman, et al., (eds. 1990) Godman and Gilman´s: The pharmacological bases of therapeutics, 8 th Ed., Pergamon Press, a Remongton´s Pharmaceutical Sciences, 17 th ed. (190), Mack Publishing Co., Easton, Penn, Avis et al., (eds 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY, Lieberman, et al., (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY a Lieberman, et al., (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY. Terapie podle vynálezu se může kombinovat nebo použít ve spojení s jinými terapeutickými činidly, zvláště agonosty nebo antagonisty jiných členů rodiny cytokinových receptorů.

IX. Testování

Testování léku za použití DCRS5 nebo jeho fragmentu se může uskutečnit za účelem identifikace sloučenin, které

vykazují vazebnou afinitu na podjednotku receptoru zahrnující izolaci asociovaných komponentů. Následné biologické testy se mohou pak využívat ke stanovení, zda sloučenina vykazuje intrinsickou stimulující aktivitu a působí proto jako blokační činidlo nebo antagonista, čímž blokuje aktivitu ligandu.

Avšak párování ligandu p40/IL-B30 s funkčním receptorem DCRS3 s IL-12Rβ1, umožňuje testování za účelem zjištění antagonistů a agonistů s pozitivní kontrolou signálu. Může se uskutečnit testování malých molekul nebo protilátek.

Jedna metoda testování léků využívá eukaryontní nebo prokaryontní hostitelské buňky, které se stabilně transformují s molekulami rekombinantní DNA exprimující DCRS5 v kombinaci s jinou podjednotkou cytokinového receptoru, jako je například IL-12Rβ1. Věří se, že signalizace používá STAT 4. Mohou být izolovány buňky, které exprimují receptor separovaný od jiných funkčních receptorů. Takové buňky, buď v životaschopné nebo imobilizované formě, se mohou použít v případě standardního vazebného testu protilátka/antigen nebo ligand/receptor. V publikaci Parce et al., (1989) Science 246: 243-247 a Owicki, et al., (1990) Proc. Nat´l. Acad. Sci. USA 87: 4007-4011 se popisují citlivé metody detekující buněčné odezvy. Kompetitivní testy je možné zvláště použít v případě, že buňky přicházejí do kontaktu a inkubují se se značeným receptorem nebo protilátkou vykazující známou vazebnou afinitu vůči ligandu. Protilátka značená ^{125}I přichází do kontaktu s testovaným vzorkem, jehož vazebná afinita vůči vazebné sloučenině se měří. Vázané a volné značené vazebné sloučeniny se pak separují, aby se odhadl stupeň navázání ligandu. Množství testované vázané sloučeniny je nepřímo úměrný množství značeného receptoru vázajícího se na známý zdroj. K separaci vázaného ligandu od volného ligandu za účelem zjištění stupně navázání ligandu. Tento krok separace se v typickém případě podílí na postupu, jako je adheze na filtry

následovaná promýváním, adheze na plast následovaná promýváním nebo centrifugací buněčných membrán. Životaschopné buňky by se mohly také použít k testování účinků léků na funkce zprostředkované cytokinem, jako je například signalizace STAT4 a jiné. Některé detekční metody umožňují eliminovat krok separace, například použitím citlivého detekčního systému.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Obecné metody

Některé ze standardních metod se popisují například v publikaci Maniatis, et al., (1982) Molecular Clonning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Hrabor Press, Sambrook, et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2d ed.), vols. 1-3, CSH Press, NY nebo Ausubel, et al., (1987 and Supplements) Current Protocols in Molecular Biology, Grrene/Wiley, New York. Metody čištění proteinů zahrnují takové metody, jako je srážení síranem amonným, kolonová chromatografie, elektroforéza, centrifugace, krystalizace a jiné (popisuje se v publikaci Ausubel, et al., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY nebo Ausubel, et al., (1987 a periodické doplňky) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York, Deutscher (1990) Guide to protein purification, Methods in Enzymology, vol. 182 a jiné díly v této sérii, manuály od výrobce popisující použití produktů izolace proteinů (Pharmacia, Pisctaway, N. J. nebo Bio-Rad, Richmond, CA). Kombinace s rekombintními metodami umožňující fúze s vhodnými segmenty, například se sekvencí FLAG nebo s ekvivalentem, který může být fúzován prostřednictvím sekvence, kterou je možné odstranit proteinázou (popisuje se v publikaci Hochuli (1990), Purification of recombinant proteins with metal chelate absorbent, Setlow (ed.) Genetic Engeneering, Principle and Methods 12: 87-98, Plenum Press, N.Y. a Crowe, et al., (1992)

QIA express: The high level expression and Protein purification systém QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA).

Počítačová analýza sekvence se uskutečnila například použitím softwarových programů, které zahrnují programy pocházející z GCG (U. Wisconsin) a ze zdrojů GenBank. Také se použila veřejná databáze sekvencí, jako je například GenBank a jiné.

Řada metod aplikovatelných na receptory IL-10 se mohou aplikovat na DCRS5, jak se popisuje v patentovém dokumentu č. 5 789 192 (receptor IL-10).

Příklad 2: Funkční klonování

Zjistilo se, že protilátky proti hIL-12Rβ1 blokovaly odezvy na lidské buňky T na p40/IL-B30 a p40/IL-B30 vázaný na IL-12Rβ1. To naznačuje, že IL-12Rβ1 je jedna podjednotka receptorového komplexu pro p40/IL-B30.

Identifikovala se jedna populace T buněk, která odpovídá na p40/IL-B30, ale nikoliv na IL-12, a jiné populace, které odpovídají na IL-12, ale nikoliv na p40/IL-B30. Navíc se pozorovalo, že buňky Ba/F3 exprimující rekombinantní mIL-12Rβ1 a mIL-12Rβ2 odpovídaly na IL-12, ale neodpovídaly na p40/IL-B30. Tyto výsledky kolektivně indikovaly, že receptorový komplex pro p40/IL-B30 obsahoval IL-12Rβ1 a alespoň jednu jinou podjednotku, kterou nebyla IL-12Rβ1. Podobně expresívní klonovací strategie se navrhla, aby se izoloval druhý receptorový komponent.

Knihovna cDNA se připrvila z mRNA, která se izolovala z buněk Kit225, z buněčné linie lidských buněk T závislých na IL-2, která odpovídá na IL-12 i na p40/IL-B30. cDNA se připravila použitím retrovirového expresívního vektoru pMX.

Buňky Ba/F3 exprimující rekombinantní hIL-12Rβ1 se infikovaly touto knihovnou cDNA, nechaly se po 3 až 4 dny inkubovat v IL-3, pak se promyly a nanesly se na destičky s 96 prohlubněmi s koncentrací přibližně 15 000 buněk na jednu prohlubeň v kultivačním médiu obsahujícím 50 ng/ml hyper-hp40/hIL-B30 (popisuje se v publikaci WO 01/18051). Kultury se doplňovaly každých 5 dní dalším hyper-hp40/hIL-B30. Přibližně po dvou týdnech 5 až 10 % prohlubní vykazovalo růst buněk. Shromáždily se buňky z každé prohlubně, jednotlivě se expandovaly do větších kultur v hyper-hp40/hIL-B30 a testovala se závislost jejich růstu na hyper-hp40/hIL-B30.

U buněk, jejichž růst závisel na p40/IL-B30, se analyzovala pomocí PCR přítomnost inzertů retrovirové cDNA. Ze 40 analyzovaných izolátů pouze jeden obsahoval cDNA kódující nový receptor DCRS5. Tento kandidát lidské cDNA se klonoval do expresívního vektoru a transfekoval se do buněk Ba/F3 exprimujících hIL-12Rβ1. Tyto buňky začaly vykazovat odezvu na p40/IL-B30, což ukazuje, že nová cDNA kóduje požadovaný CDRS5, funkčně receptorovou jednotku IL-B30.

Příklad 3: Rysy proteinu DCRS5 plné délky, lokalizace na chromozomu

Cytoplazmatická oblast DCRS5 není blízce příbuzná jiným cytoplazmatickým oblastem cytokinového receptoru. Cytoplazmatická oblast obsahuje sedm zbytků tyr, alespoň tři z nich jsou částí rozeznatelných vazebných motivů SH2: YEDI, YKPQ a YFPQ. Motiv YEDI je podobný identifikovaným vazebným místům pro tyrozinovou fosfatázu shp2. Pozdější dva motivy jsou velice podobné sekvencím známým tím, že váží Stat1/Stat3 nebo Stat3. Motiv YKPQ spolu s nejbližšími sousedícími sekvencemi se také podobá stupni motivů v Stat4 a IL-12Rβ2, o kterém se ví, že se váže na Stat1-3. To souhlasí s dosavadními

daty, která naznačují, že p40/IL-B30 podobně jako IL-12 aktivuje Stat4.

Primery PCR získané ze sekvence DCRS5 se používají pro testování knihovny lidské cDNA. Sekvence se mohly získat například z tabulky č. 1, s výhodou jsou ty sekvence přilehlé ke koncům sekvencí. cDNA plné délky odpovídající DCRS5 primáta, hlodavce nebo jiných druhů se klonovala například testováním DNA hybridizace fága λgt10. Reakce PCR se provedly použitím DNA polymerázy Taqplus z mikroorganizmu T.aquaticus (Stratagene) za vhodných podmínek.

Připravily se smíry chromozomů. Hybridizace in situ se provedla s chromozomy získanými z lidských lymfocytů stimulovaných fytohemagglutininem kultivovaných po dobu 72 hodin. 5-bromodeoxyuridin se přidával během posledních sedmi hodin kultivace (60 µg/ml kultivačního média), aby se zajistila dobrá viditelnost pruhů chromozomální DNA po hybridizaci.

Fragment PCR amplifikovaný pomocí primerů se klonoval do vhodného vektoru. Vektor je značen posunem jednořetězcového zlomu s ^{3}H. Radioaktivně značená sonda se hybridizovala s metafázovým smírem v konečné koncentraci 200 ng/ml hybridizačního roztoku, jak se popisuje v publikaci Mattei, et al., (1985) Hum. Genet. 69: 327-331.

Po potažení jadernou emulzí (KODAK NTB2) se sklíčka exponovala. Aby se zabránilo sklouznutí libovolných částic stříbra během páskovací zobrazovací metody, chromozomální smír se nejdříve obarví pufrovaným roztokem Giemsa a metafáze se vyfotografuje. R-páskování se pak uskuteční metodou fluorochrom-fotolyze-Giemsa (FPG) a metafáze se před analýzou opět vyfotografuje.

V případě jiných druhů se používají podobné vhodné metody.

Příklad 4: Lokalizace mRNA DCRS5

Lidská mnohotná tkáň (kat. č. 1,2) a bloty buněčných linií zhoubného bujení (kat. č. 7751-7) obsahující přibližně 2 μg poly(A)$^+$RNA v jedné dráze se získaly od firmy Clontech (Palo Alto, CA). Sondy se značily radioaktivně pomocí [α-^{32}P]dATP, například použitím značicích sad Amersham Rediprime náhodných primerů (RPN1633). Prehybridizace a hybridizace se provedly například při teplotě 67 °C v 0,5 M Na_2HPO_4, 7% SDS, 0,5 M EDTA (pH 8,0). Promývání za vysoké přísnosti se provedlo například při teplotě 65 °C, kdy na začátku se promávaní opakuje dvakrát za podmínek 2x koncentrovaný SSC, 0,1 % SDS po dobu 40 minut, pak následuje promytí 0,1x koncentrovaným SSC, 0,1 % SDS po dobu 20 minut. Mebrány se pak ozářily paprsky X na film Kodak při teplotě 70 °C za použití štítu, který zesiluje záření. Detailnější studie pomocí metody Southernovy hybridizace knihovny cDNA se provedla s vybranými vhodnými klony lidského DCRS5, kdy se testovala exprese v krvetvorných nebo jiných buňkách.

V jiném případě se z tabulky č. 1 vybraly dva vhodné primery. RT-PCR se použily při testování vhodného vzorku mRNA za účelem zjištění přítomnosti message k produkci cDNA, například vzorek, který exprimuje gen.

Klony v plné délce se mohou izolovat hybridizací knihoven cDNA z vhodných tkání předem vybraným signálem PCR. Mohou se provést northernovy bloty.

Mesage vhodný pro geny kódující DCRS5 se budou testovat vhodnou technologií, například pomocí PCR, imunologickými testy, hybridizací nebo jinými způsoby. cDNA tkáně nebo orgánů je možné získat od firmy například Clontech, Mountain View, CA. Jak se popisuje, je možné použít identifikace zdrojů přirozené exprese. Stanovení párování funkčních receptorových

podjednotek umožňuje předpovědět, co buňky exprimují při kombinaci receptorových podjednotek, jejichž odpovědí je fyziologická odezva na každý cytokinový ligand.

V případě distribuce u myší se provedla například Southernova analýza. DNA (v množství 5 μg) z primárně amplifikované knihovny cDNA se štěpilo vhodnými restrikčními enzymy, aby se uvolnily inzerty, nechaly se dělit na 1% agarózovém gelu a přenesly se na nylonovou membránu (Schleicher and Shuell, Keene, NY).

Vzorky izoloace mRNA z myší mohou zahrnovat buněčnou linii myších fibroblastových buněk L (C200), buňky tranfekované Braf:ER (Brafova fúze s receptorem estrogenu), kontrola (C201), T buňky TH1 polarizované („Mell4 bright", buňky CD4+ pocházející ze sleziny se polarizovaly po dobu 7 dní pomocí IL-4 a anti-IFN-γ, T201), T buňky vysoce polarizované TH1 (popisuje se v publikaci Openshaw, et al., (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367, aktivované s anti-CD3 po dobu 2, 6 a 16 hod, T201) T buňky vysoce polarizované TH2 (popisuje se v publikaci Openshaw, et al., (1995) J. Exp. Med. 182: 1357-1367, aktivované anti-CD3 po dobu 2, 6, 16 hod, T203), CD44-CD25+pre T buňky , získané z brzlíku (T204), TH1 T buňky klon D1.1 nechávají se v klidu po dobu 3 týdnů po poslední stimulaci antigenem (T205), buňky TH1 T klon D1.1, které se stimulovaly ConA v koncentraci 10 μg/ml po dobu 15 hod (T206), buňky TH2 T klon CDC35, které se stimulovaly ConA v koncentraci 10 μg/ml (T208), naívní buňky Mell4+ pocházející ze sleziny (T209), T buňky Mell4+ polarizované na Th1pomocí IFN-γ/IL-12/anti-IL-4 po dobu 6, 12, 24 hod (T210), buňky T Mell4+ polarizoané na Th2 pomocí IL-4/anti-IFN-γ po dobu 6, 13, 24 hod (T211), nestimulované přirozené buňky B buněčné linie A20 (B200), nestimulovaná buněčná linie buněk B CH12 (B201), nestimulované velké buňky B pocházející ze sleziny (B202), buňky B

pocházející z celé sleziny aktivované pomocí LPS (B203), dendritické buňky obohacené metrizamidem pocházející ze sleziny (D200), dendritické buňky pocházející z kostní dřeně (D201), monocytická buněčná linie RAV 264.7 aktivovaná s LPS po dobu 4 hod (M200), makrofágy z kostní dřeně získané pomocí GM a M-CSF (M201), buněčná linie makrofágů J774 (M202), buněčná linie makrofágů J774+LPS-anti-IL-10 shromažďované po při 0,5, 1, 3, 6, 12 hod (M204), tkáň z plic myší imunizované aerosolem, primery Th2, aerosol OVA, imunizace po 7, 14, 23 hod (popisuje se v publikaci Garlisi et al., (1995) Clinical Immunology and Immunopathology 75: 75-83, X206), tkáň z plic infikovaná Nippostrongulus (popisuje se v publikaci Coffman, et al., (1989) Science 245: 308-310, X200), Celé dospělé plíce, normální (O200), celé plíce, rag-1 (popisuje se v publikaci Schwarz, et al., (1993) Immunodeficiency 4: 249-252, O205), IL-10 K.O. slezina (popisuje se v publikaci Kuhn et al., (1991) Cell 75: 263-274, X201), celá slezina dospělého jedince, normální (201), celá slezina, rag-1 (O207), IL-10 K.O. Peyerovy skvrny (O202), celé Peyerovy skvrny normální (O210), IL-10 K.O. mesenterické lymfoidní žlázy (X203), celé mesenterické lymfoidní žlázy, normální (O211), IL-10 K.O. střevo (X203), celé normální střevo (O212), myší pankreas NOD (popisuje se v publikaci Makino et al., (1980) Jikken Dobutsu 29: 1-13, X205), cylý brzlík, rag-1 (O208), celé ledviny, rag-1 (O206), krysí normální kloubní tkáň (O300) a krysí artritická klobní tkáň (X300).

Vzorek vhodný pro izolaci lidské mRNA může zahrnovat mononukleární buňky periferní krve (monocyty, T buňky, buňky NK, granulocyty, buňky B) (T100), shromážděné jednojaderné buňky periferní krve aktivované pomocí anti-CD3 po dobu 2, 6, 12 hod (T101), T buňky TH0. klon Mot 72 (T102), shromážděné T buňky TH0 klon Mot 72 aktivované pomocí anti-CD28 a anti-CD3 po dobu 2, 7, 12 hod (T111), T buňky CD4+CD45RO-T buňky

polarizované po dobu 27 dní v anti-CD28, Il-4 a anti-IFN-γ polarizované TH2 a aktivovaní pomocí anti-CD3 a anti-CD28 po dobu 4 hod (T116), T buňky nádorové linie Jurkat a Hut 78 (T117), klony T buněk, shromážděné AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, (T118), buňky T, náhodný klon γδ T buněk (T119), splenocyty (B100), splenocyty aktivované pomocí anti-CD40 a IL-4 (B101), shromážděné buňky B linií EBV WT49, RSB, JY, CVIR 721.221, RM3, HSY, (B102), linie buněk B JY aktivovná pomocí PMA a ionomycinem po dobu 1, 6 hod (B103), shromážděné klony buněk NK 20 aktivované PMA a ionomycinem po dobu 6 hod (K101), klon NKL získaný z periferní krve pacienta trpícího leukemií LGL, kterému se aplikovalo IL-2 (K106), NK cytotoxický klon 640-A30-1 (K107), krvetvorná prekurzorová buněčná linie TF1 aktivovaná pomocí PMA a ionomycinu po dobu 1, 6 hod (C100), U937 premonocytická linie (M100), shromážděná premonocytická linie (U937) aktivovaná pomocí PMA a ionomycinem po dobu 1, 6 hodin (M101), shromážděné rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, IFNγ, anti-IL-10 po dobu 1, 2, 6, 12, 24 hod (M102), rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, IFNγ, anti-IL-10 po dobu 1, 2, 6, 12, 24 hod (M102), shromážděné rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, IFNγ, anti-IL-10 po dobu 1, 2, 6, 12, 24 hod (M103), shromážděné rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, IFNγ, anti-IL-10 po dobu 4, 16 hod (M106), shromážděné rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, IFNγ, anti-IL-10 po dobu 4 a 16 hod (M107), rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, po dobu 1 hod (M108), rozdružené monocyty aktivované pomocí LPS, po dobu 6 hod (M109), DC 70 % CD1a+ z CD34+GM-CSF, TNFα 12 dní, (D101), DC 70 % CD1a+ z CD34+GM-CSF, TNFα 12 dní, aktivované pomocí PMA a ionomycin po dobu 1 hod (D102), DC 70 % CD1a+ Z CD34+GM-CSF, TNFα 12 dní, aktivované PMA a ionomycinem po dobu 6 hodin (D103), shromážděné DC 95 % CD1a+ z CD34+ GM-CSF, TNFα 12 dní FACS, aktivované pomocí PMA a ionomycinem po dobu

1, 6 hodin (D104), shromážděné DC 95 % CD14+ z ex CD34+ GM-CSF, TNFα 12 dní FACS, aktivované pomocí PMA a ionomycinem po dobu 1, 6 hodin (D105), shromážděné DC CD1a+ CD86+ z CD34+ GM-CSF, TNFα 12 dní FACS, aktivované pomocí PMA a ionomycinem po dobu 1, 6 hodin (D106), DC z monocytů GM-CSF, IL-4 5 dní (D107), DC z monocytů GM-CSF, IL-4 5 dní (D108), shromážděné DC z monocytů GM-CSF, IL-4 5 dní aktivované LPS po dobu 4, 16 hodin (D109), shromážděné DC z monocytů GM-CSF, IL-4 5 dní aktivované TNFα, mopnocyty supe po dobu 4, 16 hodin (D110), benigní nádor leiom L11 (X101), normální myometrium M5 (O115), maligní leiomyosarkom GS1 (X103), shromážděná linie sarkomu plicního fibroblastu MRC5 aktivovaná pomocí PMA a ionomycinu po dobu 1, 6 hod (C101), shromážděná buněčná linie karcinomu ledvinového epitelu CHA aktivovaná pomocí PMA a ionomycinu po dobu 1, 6 hod (C102), ledviny plodu muže stáří 28 týdnů (O100), plíce plodu muže stáří 28 týdnů (O101), játra plodu muže stáří 28 týdnů (O102), srdce plodu muže stáří 28 týdnů (O103), mozek plodu muže stáří 28 týdnů (O104), žlučník plodu muže stáří 28 týdnů (O106), tenké střevo plodu muže stáří 28 týdnů (O107), tuková tkáň plodu muže stáří 28 týdnů (O108), vaječníky plodu ženy stáří 25 týdnů (O109), děloha plodu ženy stáří 25 týdnů (O110), varlata plodu muže stáří 28 týdnů (O111), slezina plodu muže stáří 28 týdnů (O112), placenta ženy stáří 25 týdnů (O109), placenta dospělého jedince (O113) a zánětlivé mandle z jedince ve věku 12 let (X100).

Podobné vzorky se mohou za účelem hodnocení izolovat i v jiných druzích.

Příklad 5: Klonování druhových doplňků DCRS5

Aby se získaly druhové doplňky DCRS5 přednostně z jiných primátů nebo hlodavců, se používaly jiné strategie. Jednou metodou je zkřížená hybriizace za použití DNA sond úzce

příbuzných druhů. To je možné použít u vývojově podobných druhů, jako intermediální krok. Jinou metodou je použití specifických primerů PCR založených na identifikaci bloků podobnosti nebo rozdílů mezi geny, jako jsou například plochy vysoce konzervativního nebo nekonzervativního polypeptidu nebo nukleotidové sekvence.

Prohledáváním databáze se mohou identifikovat podobné sekvence a umožní se produkce vhodných sond.

Příklad 6: Produkce savčího proteinu DCRS5

Provedla se vhodná funkční konstrukce, například GST, pro expresi například v mikroorganizmu E. coli. Zkonstruoval se myší plazmid IGIF pGex a transformoval se do mikroorganizmu E. coli. Čerstvě transformované buňky se kultivovaly například v médiu LB, které obsahuje ampicilin v koncentraci 50 μg/ml, a exprese se indukovala pomocí IPTG (firma Sigma, St. Louis, MO). Po indukci přes noc se bakterie sklízely a izoloval se pelet obsahující protein DCRS5. Pelety se homogenizovaly například v pufru TE (50 mM báze Tris pH 8,0, 10 mM EDTA a 2 mM pefabloc) o objemu 2 litrů. Tento materiál procházel třikrát přes mikrofluidizér (Microfluidics, Newton, MA). Fluidizovaný supernatant se se centrifugoval na rotoru Sorwall GS-3 po dobu 1 hodiny při 13 000 otáčkách za minutu. Výsledny supernatant obsahující cytokinový receptorový protein se filtroval a procházel přes kolonu naplněnou glutathion-Sepharose uvedenou do rovnováhy 50 mM bází Tris pH 8,0. Shromáždily se frakce obsahující fúzní protein DCRS5-GST a štěpily se například trombinem (Enzyme Research Laboratory, Inc. South Bend, IN). Štěpené frakce pak prošly kolonou naplněnou Q-Sepharose, která se uvedla do rovnováhy 50 mM bazí Tris. Frakce obsahující DCRS5 se shromáždily a ředily se chladnou destilovanou vodou, aby se snížila konduktuvita. Pak

znovu prošly samotnou kolonou s čerstvou náplní Q-Sepharose nebo následovala kolona s imunoafinitní protilátkou. Spojily se frakce obsahující protein DCRS5, vytvořily se alikvoty a uchovávaly se při teplotě -70 °C.

Porovnání spektra CD s proteinem cytokinového receptoru může naznačit, že protein je správně sbalen (popisuje se v publikaci Hazuda, et al., (1969) J. Biol. Chem. 264: 1689-1693).

Příklad 7: Příprava protilátek specifických pro DCRS5

Inbrední myši Balb/c se imunizovaly intraperitoneálně s rekombinantními formami proteinu, jako je například čištěný DCRS5 nebo stabilně transfekované buňky NIH-3T3. Zvířata se imunizovala zselující dávkou ve vhodném časovém okamžiku s proteinem, ke ketrému se přidalo adjuvans, za účlem dále stimulovat produkci protilátek. Shromáždilo se sérum nebo hybridoma produkované slezinou.

V jiném případě se myši Balb/c imunizovaly buňkami transformovanými genem nebo jeho fragmentem, buď endogenními nebo exogenními buňkami nebo izolovanými membránami obohacenými expresí antigenu. Ve vhodném čase se shromáždilo sérum, v typickém případě po řadě různých aplikacích. Mohou se použít různé techniky genové terapie. Může to být například prodikce proteinu in situ za účelem vyvolání imunitní odezvy. Příprava séra nebo protilátky se může zkříženě absorbovat nebo imunologicky vybrat za účelem přípravy podstatně izolovaných protilátek s definovanou specifitou a vysokou afinitou.

Mohou se připravit monoklonální protilátky. Splenocyty se například fúzují s vhodným fúzním partnerem a hybridomy se slektují v růstovém médiu pomocí standardních postupů. Supernatant hybridomů se testoval za účelem zjištění

přítomnosti protilátek, které se vážou na DCRS5, například testem ELISA nebo jiným testem. Mohou se také vytvořit nebo připravit protilátky, které specificky rozeznávají specifické provedení DCRS5.

Při jiné metodě jsou syntetické peptidy nebo izolovaný protein prezentovány imunnímu systému za účelem vytvoření monoklonálních nebo polyklonálních protilátek (popisuje se v publikaci Coligan et al., (ed. 1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Grrene a Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press. Ve vhodných situacích se vazebné činidlo buď značí, jak se popisuje shora v textu například fluoresceinem nebo jiným prostředkem, nebo se imobilizuje na substrátu v případě panoramatických metod. Nukleové kyseliny se mohou také zavést do buněk zvířat za účelem produkce antigenu, který slouží k vyvolání imunitní odezvy (popisuje se v publikaci Wang et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 4156-4160, Barry, et al., (1994) BioTechniques 16: 616-619 a Xiang et al., (1995) Immunity 2: 129-135).

Příklad 8: Produkce fúzních proteinů s DCRS5

Připravily se různé funkční konstrukce s DCRS5, které zahrnují provedení kombinující DCRS5 s IL-12Rβ1. Část vhodného genu se fúzovala s epitopem tag, jako například FLAG tag nebo s konstrukcí dvou hybridních systémů (popisuje se například v publikaci Fields and Song (1989) Nature 340: 245-246).

Epitop tag se může použít při expresivním klonovacím postupu s detekcí s protilátkami proti FLAG za účelem detekovat vazebného partnera, jako je například ligand vhodný pro cytokinový receptor. Dva hybridní systémy se mohou také použít k izolaci proteinů, které se specificky váží na DCRS5.

Příklad 9: Vztah mezi strukturou a aktivitou

Použitím standardních postupů a analýz se získaly informace o kritické úloze určitých zbytků. Provedla se standardní analýza mutageneze například vytvořením řady různých variant v určité poloze, například v polohách identifikovaných shora v textu, a hodnocením biologických aktivit variant. To je možné uskutečnit za účelem rozšířit určující polohy, které upravují aktivitu nebo ukazují na speicifické polohy za účelem stanovení zbytků, které se mohou substituovat, přičemž se uchovává, blokuje nebo se upravuje biologická aktivita.

V jiném případě analýza přirozených variant může definovat polohy, které tolerují přirozené mutace. To může vyplývat z populační analýzy variací mezi jednotlivci nebo v kmenech nebo druzích. Vzorky z vybraných jednotlivců se analyzovaly například metodou PCR a sekvenováním. To umožňuje hodnotit polymorfizmy populace.

Příklad 10: Společná exprese DCRS5 a IL-12Rβ1

Vektor nebo vektory kódující geny se mohou transfekovat do buňky. Takový vektor bude s výhodou zahrnovat selekční markery za účelem identifikace, které buňky se úspěšně transformovaly. Společná exprese dvou genů umožní genovým produktům se správně spojit a vytvořit aktivní receptorový komplex.

V alternativním případě jsou dostupné metody způsobující spojení funkčních dimerů (popisuje se v publikaci O´Shea, et al., (1989) Science 245: 646-648, Kostelny et al., (1992) J. Immunol. 148: 1547-1553 a Patel, et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 30386-30391). Výsledkem exprese extrabuněčných domén a fyzikální asociace, například řízená afinitou leucinového zipu Fos/Jun, budou konstrukce vázající ligand, které by měly

působit jako vazebné sloučeniny vhodné pro diagnostické nebo léčebné použití.

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 2 859 párů bazí

(B) TYP: nukleotidová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: primát; domníváme se, že homo sapiens

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: CDS

(B) Pozice: 119 ..2005

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: mat_peptid

(B) Pozice: 188 ..2005

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: misc_feature

(C) Pozice: 1 ..2859

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

```
gtggtacggg aattccattg tgttgggcag ccaacaaggg tggcagcctg gctctgaagt 60

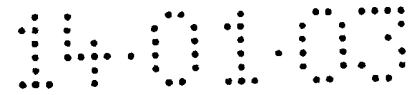
ggaattatgt gcttcaaaca ggttgaaaga gggaaacagt cttttcctgc ttccagac   118

atg aat cak gtc act att caa tgg gat gca gta ata gcc ctt tac ata   166
Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
            -20                 -15                 -10

ctc ttc agc tgg tgt cat gga gga att aca aat ata aac tgc tct ggc   214
Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
         -5              -1   1              5

cac atc tgg gta gaa cca gcc aca att ttt aag atg ggt atg aat atc   262
His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
 10                  15                  20                  25

tct ata tat tgc caa gca gca att aag aac tgc caa cca agg aaa ctt   310
Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
                 30                  35                  40
```



```
cat ttt tat aaa aat ggc atc aaa gaa aga ttt caa atc aca agg att   358
His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
            45                  50                  55

aat aaa aca aca gct cgg ctt tgg tat aaa aac ttt ctg gaa cca cat   406
Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
        60                  65                  70

gct tct atg tac tgc act gct gaa tgt ccc aaa cat ttt caa gag aca   454
Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
    75                  80                  85

ctg ata tgt gga aaa gac att tct tct gga tat ccg cca gat att cct   502
Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
90                  95                  100                 105

gat gaa gta acc tgt gtc att tat gaa tat tca ggc aac atg act tgc   550
Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
                110                 115                 120

acc tgg aat gct rgg aag ctc acc tac ata gac aca aaa tac gtg gta   598
Thr Trp Asn Ala Xaa Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
            125                 130                 135

cat gtg aag agt tta gag aca gaa gaa gag caa cag tat ctc acc tca   646
His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
        140                 145                 150

agc tat att aac atc tcc act gat tca tta caa ggt ggc aag aag tac   694
Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr
    155                 160                 165

ttg gtt tgg gtc caa gca gca aac gca cta ggc atg gaa gag tca aaa   742
Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
170                 175                 180                 185

caa ctg caa att cac ctg gat gat ata gtg ata cct tct gca gcc gtc   790
Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
                190                 195                 200

att tcc agg gct gag act ata aat gct aca gtg ccc aag acc ata att   838
Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
            205                 210                 215

tat tgg gat agt caa aca aca att gaa aag gtt tcc tgt gaa atg aga   886
Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
        220                 225                 230

tac aag gct aca aca aac caa act tgg aat gtt aaa gaa ttt gac acc   934
Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
    235                 240                 245

aat ttt aca tat gtg caa cag tca gaa ttc tac ttg gag cca aac att   982
Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
250                 255                 260                 265

aag tac gta ttt caa gtg aga tgt caa gaa aca ggc aaa agg tac tgg  1030
Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
                270                 275                 280
```

```
cag cct tgg agt tca ccg ttt ttt cat aaa aca cct gaa aca gtt ccc   1078
Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
            285                 290                 295

cag gtc aca tca aaa gca ttc caa cat gac aca tgg aat tct ggg cta   1126
Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
        300                 305                 310

aca gtt gct tcc atc tct aca ggg cac ctt act tct gac aac aga gga   1174
Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
    315                 320                 325

gac att gga ctt tta ttg gga atg atc gtc ttt gct gtt atg ttg tca   1222
Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
330                 335                 340                 345

att ctt tct ttg att ggg ata ttt aac aga tca ttc cga act ggg att   1270
Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
                350                 355                 360

aaa aga agg atc tta ttg tta ata cca aag tgg ctt tat gaa gat att   1318
Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
            365                 370                 375

cct aat atg aaa aac agc aat gtt gtg aaa atg cta cag gaa aat agt   1366
Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
        380                 385                 390

gaa ctt atg aat aat aat tcc agt gag cag gtc cta tat gtt gat ccc   1414
Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro
    395                 400                 405

atg att aca gag ata aaa gaa atc ttc atc cca gaa cac aag cct aca   1462
Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
410                 415                 420                 425

gac tac aag aag gag aat aca gga ccc ctg gag aca aga gac tac ccg   1510
Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
                430                 435                 440

caa aac tcg cta ttc gac aat act aca gtt gta tat att cct gat ctc   1558
Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
            445                 450                 455

aac act gga tat aaa ccc caa att tca aat ttt ctg cct gag gga agc   1606
Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
        460                 465                 470

cat ctc agc aat aat aat gaa att act tcc tta aca ctt aaa cca cca   1654
His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
    475                 480                 485

gtt gat tcc tta gac tca gga aat aat ccc agg tta caa aag cat cct   1702
Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
490                 495                 500                 505

aat ttt gct ttt tct gtt tca agt gtg aat tca cta agc aac aca ata   1750
Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile
                510                 515                 520
```

ttt ctt gga gaa tta agc ctc ata tta aat caa gga gaa tgc agt tct 1798
Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser
525 530 535

cct gac ata caa aac tca gta gag gag gaa acc acc atg ctt ttg gaa 1846
Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu
540 545 550

aat gat tca ccc agt gaa act att cca gaa cag acc ctg ctt cct gat 1894
Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp
555 560 565

gaa ttt gtc tcc tgt ttg ggg atc gtg aat gag gag ttg cca tct att 1942
Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile
570 575 580 585

aat act tat ttt cca caa aat att ttg gaa agc cac ttc aat agg att 1990
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile
590 595 600

tca ctc ttg gaa aag tagagctgtg tggtcaaaat caatatgaga aagctgcctt 2045
Ser Leu Leu Glu Lys
605

gcaatctgaa cttgggtttt ccctgcaata gaaattgaat tctgcctctt tttgaaaaaa 2105

atgtattcac atacaaatct tcacatggac acatgttttc atttcccttg gataaatacc 2165

taggtagggg attgctgggc catatgataa gcatatgttt cagttctacc aatcttgttt 2225

ccagagtagt gacatttctg tgctcctacc atcaccatgt aagaattccc gggagctcca 2285

tgccttttta attttagcca ttcttctgcc tmatttctta aaattagaga attaaggtcc 2345

cgaaggtgga acatgcttca tggtcacaca tacaggcaca aaaacagcat tatgtggacg 2405

cctcatgtat tttttataga gtcaactatt tcctctttat tttccctcat tgaaagatgc 2465

aaaacagctc tctattgtgt acagaaaggg taaataatgc aaaatacctg gtagtaaaat 2525

aaatgctgaa aatttttctt taaaatagaa tcattaggcc aggcgtggtg gctcatgctt 2585

gtaatcccag cactttggta ggctgaggtr ggtggatcac ctgaggtcag gagttcgagt 2645

ccagcctggc caatatgctg aaaccctgtc tctactaaaa ttacaaaaat tagccggcca 2705

tggtggcagg tgcttgtaat cccagctact tgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa 2765

ccaggaaggc agaggttgca ctgagctgag attgtgccac tgcactccag cctgggcaac 2825

aagagcaaaa ctctgtctgg aaaaaaaaaa aaaa 2859

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 629 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE: TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

```
Met Asn Xaa Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
-20                 -15                 -10
Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
-5              -1  1                   5
His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
10                  15                  20                  25
Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
                30                  35                  40
His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
            45                  50                  55
Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
        60                  65                  70
Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
    75                  80                  85
Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
90                  95                  100                 105
Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
                110                 115                 120
Thr Trp Asn Ala Xaa Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
            125                 130                 135
His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
        140                 145                 150
Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr
    155                 160                 165
Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
170                 175                 180                 185
Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
                190                 195                 200
Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
            205                 210                 215
Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
        220                 225                 230
Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
    235                 240                 245
Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
250                 255                 260                 265
Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
                270                 275                 280
Gln Pro Trp Ser Ser Pro Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
            285                 290                 295
```

Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
300 305 310

Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
315 320 325

Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
330 335 340 345

Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
350 355 360

Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
365 370 375

Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
380 385 390

Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro
395 400 405

Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
410 415 420 425

Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
430 435 440

Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
445 450 455

Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
460 465 470

His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
475 480 485

Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
490 495 500 505

Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile
510 515 520

Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser
525 530 535

Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu
540 545 550

Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp
555 560 565

Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile
570 575 580 585

Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile
590 595 600

Ser Leu Leu Glu Lys
605

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1887 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: misc_feature

(D) Pozice: 1 ..1887

(D) Jiné informace:

/poznámka: symbol a může být a, c, g nebo t/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

atgaaycayg tnacnathca rtgggaygcn gtnathgcny tntayathyt nttywsntgg 60

tgycayggng gnathacnaa yathaaytgy wsnggncaya thtgggtnga rccngcnacn 120

athttyaara tgggnatgaa yathwsnath taytgycarg cngcnathaa raaytgycar 180

ccnmgnaary tncayttyta yaaraayggn athaargarm gnttycarat hacnmgnath 240

aayaaracna cngcnmgnyt ntggtayaar aayttyytng arccncaygc nwsnatgtay 300

tgyacngcng artgyccnaa rcayttycar garacnytna thtgyggnaa rgayathwsn 360

wsnggntayc cnccngayat hccngaygar gtnacntgyg tnathtayga rtaywsnggn 420

aayatgacnt gyacntggaa ygcnmgnaar ytnacntaya thgayacnaa rtaygtngtn 480

caygtnaarw snytngarac ngargargar carcartayy tnacnwsnws ntayathaay 540

athwsnacng aywsnytnca rggnggnaar aartayytng tntgggtnca rgcngcnaay 600

gcnytnggna tggargarws naarcarytn carathcayy tngaygayat hgtnathccn 660

wsngcngcng tnathwsnmg ngcngaracn athaaygcna cngtnccnaa racnathath 720

taytgggayw sncaracnac nathgaraar gtnwsntgyg aratgmgnta yaargcnacn 780

acnaaycara cntggaaygt naargartty gayacnaayt tyacntaygt ncarcarwsn 840

garttytayy tngarccnaa yathaartay gtnttycarg tnmgntgyca rgaracnggn 900

aarmgntayt ggcarccntg gwsnwsnccn ttyttycaya aracnccnga racngtnccn 960

cargtnacnw snaargcntt ycarcaygay acntggaayw snggnytnac ngtngcnwsn 1020

athwsnacng gncayytnac nwsngayaay mgnggngaya thggnytnyt nytnggnatg 1080

athgtnttyg cngtnatgyt nwsnathytn wsnytnathg gnathttyaa ymgnwsntty 1140

mgnacnggna thaarmgnmg nathytnytn ytnathccna artggytnta ygargayath 1200

ccnaayatga araaywsnaa ygtngtnaar atgytncarg araaywsnga rytnatgaay 1260

aayaaywsnw sngarcargt nytntaygtn gayccnatga thacngarat haargarath 1320

ttyathccng arcayaarcc nacngaytay aaraargara ayacnggncc nytngaracn 1380

mgngaytayc cncaraayws nytnttygay aayacnacng tngtntayat hccngayytn 1440

aayacnggnt ayaarccnca rathwsnaay ttyytnccng arggnwsnca yytnwsnaay 1500

aayaaygara thacnwsnyt nacnytnaar ccnccngtng aywsnytnga ywsnggnaay 1560

aayccnmgny tncaraarca yccnaaytty gcnttywsng tnwsnwsngt naaywsnytn 1620

wsnaayacna thttyytngg ngarytnwsn ytnathytna aycarggnga rtgywsnwsn 1680

ccngayathc araaywsngt ngargargar acnacnatgy tnytngaraa ygaywsnccn 1740

wsngaracna thccngarca racnytnytn ccngaygart tygtnwsntg yytnggnath 1800

gtnaaygarg arytnccnws nathaayacn tayttyccnc araayathyt ngarwsncay 1860

ttyaaymgna thwsnytnyt ngaraar 1887

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 918 párů bazí

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: primát, domníváme se, že homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Val Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys
245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
260 265 270

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala
370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu
385 390 395 400

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile
405 410 415

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala
420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu
435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala
450 455 460

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
485 490 495

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
530 535 540

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
545 550 555 560

Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
565 570 575

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
610 615 620

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 862 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: primát, domníváme se, že homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile
1 5 10 15

Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp
20 25 30

Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn
35 40 45

Ile Thr Cys Ser Leu Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg
50 55 60

Arg Asn Lys Leu Ile Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His
65 70 75 80

His Gly His Ser Leu Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr
85 90 95

Thr Leu Phe Val Cys Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln
100 105 110

Ile Cys Gly Ala Glu Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln
115 120 125

Asn Leu Ser Cys Ile Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr
130 135 140

Trp Glu Arg Gly Arg Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln
145 150 155 160

Leu Ser Gly Pro Lys Asn Leu Thr Trp Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile
165 170 175

Tyr Cys Asp Tyr Leu Asp Phe Gly Ile Asn Leu Thr Pro Glu Ser Pro
180 185 190

Glu Ser Asn Phe Thr Ala Lys Val Thr Ala Val Asn Ser Leu Gly Ser
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Pro Ser Thr Phe Thr Phe Leu Asp Ile Val Arg Pro
210 215 220

Leu Pro Pro Trp Asp Ile Arg Ile Lys Phe Gln Lys Ala Ser Val Ser
225 230 235 240

Arg Cys Thr Leu Tyr Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg
245 250 255

Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val
260 265 270

Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr
275 280 285

Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser
290 295 300

Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu
305 310 315 320

Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr
325 330 335

Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu
340 345 350

Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr
355 360 365

Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr
370 375 380

Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala
385 390 395 400

Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu
405 410 415

Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu
420 425 430

Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro
435 440 445

Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly
450 455 460

Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn
465 470 475 480

Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu
485 490 495

Ile Arg Val Tyr Ala Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile
500 505 510

Leu Gly Asn Ser Lys His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn
515 520 525

Ala Ile Thr Glu Glu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile
530 535 540

Pro Val Gln Glu Gln Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp
545 550 555 560

Lys Glu Arg Asp Ser Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr
565 570 575

Arg Val Ser Gln Asn Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val
580 585 590

Thr Tyr Val Leu Trp Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser
595 600 605

His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met
610 615 620

Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile
625 630 635 640

Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala
645 650 655

Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser
660 665 670

Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro
675 680 685

Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro
690 695 700

Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His
705 710 715 720

Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His
725 730 735

Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro
740 745 750

Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys
755 760 765

Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys
770 775 780

Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr
785 790 795 800

Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala
805 810 815

Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe
820 825 830

Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu
835 840 845

Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
850 855 860

PV 2002-3698

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstatě čistý nebo rekombinantní polypeptid obsahující alespoň deset sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2.

2. Polypeptid podle nároku 1, kde

a) uvedený polypeptid obsahuje alespoň 25 sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2,

b) uvedený polypeptid je rekombinanta obsahující vnitrobuněčnou část sekvence SEQ ID NO: 2,

c) uvedený polypeptid dále obsahuje alespoň deset sousedících aminokyselin, které nejsou součástí jiné než vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2,

d) uvedený polypeptid obsahuje alespoň 25 aminokyselin extrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2,

e) uvedený polypeptid obsahuje zralou sekvenci SEQ ID NO: 2 nebo

f) uvedený polypeptid je v podstatě čistý přirozený polypeptid.

3. Rekombinanntí polypeptid podle nároku 1, který

a) obsahuje zralou skvenci uvedenou v tabulce č. 1,

b) je neglykosylovaným polypeptidem,

c) pochází z člověka,

d) obsahuje alespoň 40 sousedících aminokyselin v sekvenci SEQ ID NO: 2,

e) vykazuje alespoň tři nepřekrývající se segmenty alespoň patnácti sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2,

f) je přirozenou polymorfní variantou se sekvencí SEQ ID NO: 2,

g) je tvořen alespoň přibližně třiceti aminokyselinami,

h) vykazuje alespoň dva nepřekrývající epitopy, které jsou specifické pro DCRS5 primáta,

i) má molekulovou hmotnost alespoň 30 000 s přirozenou glykosylací,

j) je syntetický polypeptid,

k) je ve sterilní formě,

l) je ve vodném nebo pufrovaném roztoku,

m) je zachycen na pevném substrátu,

n) je konjugován s jinou chemickou částí nebo

o) je fyzikálně spojen s polypeptidem IL-12Rβ1

4. Složení sloučeniny vybrané z

a) v podstatě čistého nebo rekombinantního polypeptidu obsahujícího alespoň dva nepřekrývající se segmenty alespoň šesti sousedících aminokyselin vnitrobuněčné oblasti sekvence SEQ ID NO: 2,

b) v podstatě čistého nebo rekombinantního polypeptidu obsahujícího alespoň 12 sousedících aminokyselin vnitrobuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2 nebo

c) v podstatě čisté přirozené sekvence polypeptidu obsahující zralou sekvenci SEQ ID NO: 2.

5. Polypeptid

1) podle nároku 4a, kde

a) uvedené rozdílné nepřekrývající se segmenty:

i) zahrnují segment tvořený alespoň dvanácti aminokyselinami,

ii) zahrnují jeden segment tvořený alespoň sedmi aminokyselinami a druhý segment tvořený alespoň devíti aminokyselinami,

iii) zahrnují třetí odlišný segment obsahující alespoň šest aminokyselin nebo

iv) obsahují jeden z R355-L373, P378-L405, V407-D426, K428-D439, P441-V452, I454-G460, I465-T587 nebo N592-606 nebo

b) uvedený polypeptid dále obsahuje alespoň dva odlišné nepřesehující segmenty tvořené alespoň šesti sousedícími aminokyselinami extrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2,

2) podle nároku 4b, kde

a) uvedený segment obsahující alespoň dvanáct sousedících aminokyselin zahrnuje jeden z R355-L373, P378-L405, V407-D426, K428-D439, P441-V452, I454-G460, I465-T587 nebo N592-606 nebo

b) uvedený polypeptid dále obsahuje alespoň dva odlišné nepřekrývající se segmenty tvořené alespoň šesti sousedícími aminokyselinami extrabuněčné části sekvence SEQ ID NO: 2 nebo

3) podle nároku 4c, dále obsahuje epito vhodný pro čištění nebo detekci.

6. Polypeptid podle nároku 4, který

a) obsahuje zralou sekvenci uvedenou v tabulce č. 1,

b) je neglykosylovaný polypeptid,

c) pochází z člověka,

d) obsahuje alespoň 40 sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2,

e) vykazuje alespoň tři nepřekrývající se segmenty obsahující alespoň patnáct sousedících aminokyselin se sekvencí SEQ ID NO: 2,

f) je přirozenou polymorfní variantou sekvence SEQ ID NO: 2,

g) obsahuje alespoň přibližně 30 aminokyselin,

h) vykazuje alespoň dva nepřekrývající se epitopy, které jsou specifické pro DCRS5 primáta,

i) má molekulovou hmotnost alespoň 30 000 s přirozenou glykosylací,

j) je syntetický polypeptid,

k) je ve sterilní formě,

l) je ve vodném nebo pufrovaném roztoku,

m) je zachycen na pevném substrátu,

n) je spojen s jinou chemickou částí nebo

o) je fyzikálně spojen s polypeptidem IL-12Rβ1.

7. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje

a) v podstatě čistý polypeptid podle nároku 4 kombinovaný s proteinem IL-12Rβ1 nebo

b) uvedený polypeptid podle nároku 4 a nosič, kde uvedený nosič je

i) vodná sloučenina zahrnující vodu, fyziologický roztok a/nebo pufr a/nebo

ii) vytvořený orální, rektální, nasální, povrchovou nebo parenterální aplikaci.

8. Sada, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje polypeptid podle nároku 4 a

a) kompartment obsahující uvedný polypeptid,

b) kompartment obsahující polypeptid IL-12Rβ1,

c) kompartment obsahující p40, IL-B30 nebo polypeptid p40/IL-B30 nebo

d) instrukce pro použití nebo likvidaci čibidel v uvedené sadě.

9. Vazebná sloučenina obsahující místo vázající antigen, které pochází z protilátky, jenž se specificky váže na uvedenou vnitrobuněčnou část uvedeného polypeptidu podle nároku 1, kde

a) uvedená vazebná sloučenina je v kontejneru,

b) uvedený polypeptid pochází z člověka,

c) uvedená vazebná sloučenina je fragment Fv, Fab nebo Fab2,

d) uvedená vazebná sloučenina se konjugovala s jinou chemickou částí nebo

e) uvedená protilátka

i) vznikla proti peptidové sekvenci zralého polypeptidu uvedené v tabulce č. 1,

ii) vznikla proti zralému DCRS5,

iii) vznikla proti izolovanému lidskému DCRS5,

iv) je imunoselektivní,

v) je polyklonální protilátkou,

vi) váže se na denaturovaný DCRS5,

vii) vykazuje hodnotu Kd antigenu alespoň 30 μM,

viii) je zachycena na pevný substrát, který zahrnuje kuličky nebo plastovou membránu,

ix) je obsažena ve sterilním prostředku nebo

x) je detekovatelně značena a zahrnuje radioaktivní nebo fluorescenční značení.

10. Sada, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje vazebnou sloučeninu podle nároku 9 a

a) kompartment obsahující uvedenou vazebnou sloučeninu,

b) kompartment obsahující

i) polypeptid p40,

ii) polypeptid obsahující IL-B30,

iii) polypeptid DCRS5 a/nebo

iv) polypeptid IL-12Rβ1,

c) kompartment obsahující protilátku, která se selektivně váže na

i) polypeptid p40,

ii) polypeptid IL-B30,

iii) polypeptid DCRS5 a/nebo

iv) polypeptid IL-12Rβ1 nebo

d) instrukce pro použití a likvidaci činidel obsažených v uvedené sadě.

11. Způsob produkce komplexu antigen:protilátka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt polypeptidu DCRS5 primáta s protilátkou podle nároku 9 za vhodných podmínek, což umožňuje vznik uvedeného komplexu.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e

a) uvedený komplex se izoluje od jiných cytokinových receptorů,
b) uvedený komplex se izoloval od jiné protilátky,
c) k uvedenému kontaktu dochází se vzorkem obsahujícím interferon,
d) uvedený kontakt umožňuje kvantitativní detekci uvedeného antigenu,
e) k uvedenému kontaktu dochází se vzorkem obsahujícím uvedenou protilátku nebo
f) uvedený kontakt umožňuje kvantitativní detekci uvedené protilátky.

13. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje
a) sterilní vazebnou sloučeninu podle nároku 9 nebo
b) uvedenou vazebnou sloučeninu podle nároku 9 a nosič, kde uvedený nosič je
i) vodná sloučenina zahrnující vodu, fyziologický roztok a/nebo pufr a/nebo
ii) připraven pro orální, rektální, nasální, povrchovou nebo parenterální aplikaci.

14. Izolovaná nebo rekombinantní nukleová kyselina kodující polypeptid obsahující aminokyseliny 1 až 606 sekvence SEQ ID NO: 2.

15. Buňka nebo tkáň obsahující uvedenou rekombinantní nukleovou kyselinu podle nároku 14.

16. Buňka podle nároku 15, kterou je
a) prokaryontní buňka,
b) eukaryontní buňka,
c) bakteriální buňka,
d) buňka kvasinek,

e) hmyzí buňka,

f) savčí buňka,

g) myší buňka,

h) buňka primáta nebo

i) buňka člověka.

17. Sada, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje uvedenou nukleovou kyselinu podle nároku 14 a

a) kompartment obsahující uvedenou nukleovou kyselinu,

b) kompartment obsahující nukleovou kyselinu kodující:

i) polypeptid p40,

ii) polypeptid IL-B30,

iii) polypeptid DCRS5 a/nebo

iv) polypeptid IL-12Rβ1 nebo

c) kompartment obsahující

i) polypeptid p40,

ii) polypeptid IL-B30,

iii) polypeptid DCRS5 a/nebo

iv) polypeptid IL-12Rβ1 nebo

d) kompartment obsahující protilátku, která se selektivně váže na

i) polypeptid p40,

ii) polypeptid IL-B30,

iii) polypeptid DCRS5 a/nebo

iv) polypeptid IL-12Rβ1 nebo

e) instrukce pro použití nebo likvidaci činidel v uvedené sadě.

18. Způsob modulace fyziologie nebo vývoje buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt uvedené buňky s

a) antagonistou p40/IL-B30, který je komplex obsahující

i) extrabuněčnou část DCRS5 primáta a/nebo

ii) extrabuněčnou část IL-12Rβ1 primáta

b) antagonistou p40/IL-B30, který je protilátkou, jenž se váže komplex obsahující

i) DCRS5 primáta a/nebo

ii) IL-12Rβ1

c) antagonistou p40/IL-B30, který je protilátka, jenž se váže na DCRS5,

d) antagonistou p40/IL-B30, který je protilátkou, jenž se váže na IL-12Rβ1,

e) antagonistou p40/IL-B30, který je antisense nukleovou kyselinou pro DCRS5 nebo IL-12Rβ1 nebo

f) agonistou p40/IL-B30, který je protilátkou, jenž se váže na komplex obsahující

i) DCRS5 primáta a/nebo

ii) IL-12Rβ1 primáta.

19. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e k uvedenému kontaktu dochází s antagonistou a

a) uvedený kontakt je v kombinaci s antagonistou vůči

i) IL-12,

ii) IL-18,

iii) TNF nebo

iv) IFNγ nebo

b) uvedená buňka pochází z hostitele, který

i) vykazuje příznaky nebo projevy chronického onemocnění zprostředkovaného Th1,

ii) vykazuje projevy nebo příznaky roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy, osteoartritidy, zánětlivého onemocnění střev, cukrovky, lupénky nebo sepse nebo

iii) obdržel alogenní transplantát.

20. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený kontakt je s agonistou a

a) uvedený kontakt je v kombinaci s

i) IL-12,

ii) IL-18,

iii) TNF nebo

iv) IFNγ nebo

b) uvedená buňka pochází z hostitele, který

i) vykazuje příznaky a projevy chronické odezvy TH2,

ii) trpí nádorem, růstem virů nebo plísní,

iii) aplikovala se mu vakcína nebo

iv) trpí alergickou odezvou.

21. Nukleová kyselina podle nároku 14 obsahující nukleotidy 188 až 2005 sekvence SEQ ID NO: 1.

22. V podstatě čistý nebo rekombinantní antigenní polypeptid se sekvencí SEQ ID NO: 2.

23. Polypeptid podle nároku 22 obsahující

a) zbytky 1 až 101 sekvence SEQ ID NO: 2,

b) zbytky 102 až 195 sekvence SEQ ID NO: 2,

c) zbytky 196 až 297 sekvence SEQ ID NO: 2,

d) zbytky 1 až 328 sekvence SEQ ID NO: 2 nebo

e) zbytky 1 až 606 sekvence SEQ ID NO: 2.

24. Heterodimérová sloučenina obsahující polypeptid podle nároku 22 a IL-12Rβ1.

25. Sloučenina podle nároku 24 schopná vázat se na IL-B30/p40.

26. Sada, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje polypeptid podle nároku 22 a instrukce pro použití.

27. Sada podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e také obsahuje

a) polypeptid IL-12β1 a

b) p40, IL-B30 nebo polypeptidy IL-B30/p40.

28. Vazebná sloučenina, která se specificky váže na polypeptid podle nároku 22.

29. Vazebná sloučenina podle nároku 28, kterou je
a) polyklonální protilátka,
b) monoklonální protilátka nebo
c) fragment Fab, Fab2 nebo Fv.

30. Vazebná sloučenina podle nároku 28, která se specificky váže na polypeptid podle nároku 23.

31. Vazebná sloučenina podle nároku 30, kterou je
a) polyklonální protilátka,
b) monoklonální protilátka nebo
c) fragment Fab, Fab2 nebo Fv.

32. Sada, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje vazebnou sloučeninu podle nároku 28 a instrukce vhodné pro použití.

33. Způsob produkce komplexu antigen:protilátka, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt protilátky podle nároku 29 za podmínek vhodných pro vytvoření komplexu.

34. Izolovaný nebo rekombinantní polynukleotid kódující polypeptid podle nároku 22.

35. Polynukleotid podle nároku 34, který kóduje polypeptid podle nároku 23.

36. Polynukleotid podle nároku 34 obsahující sekvenci SEQ ID NO: 1.

37. Expresívní vektor obsahující polynukleotid podle nároku 34.

38. Hostitelská buňka obsahující expresívní vektor podle nároku 37.

39. Hostitelská buňka podle nároku 38, kterou je

a) savčí buňka,

b) buňka hmyzu,

c) bakteriální buňka nebo kvasinková buňka.

40. Způsob produkce antigenního polypeptidu se sekvencí SEQ ID NO: 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje

a) kultivaci hostitelské buňky podle nároku 38 za podmínek vhodných pro expresi polypeptidu a

b) izolaci nebo čištění polypeptidu.

41. Způsob modulace fyziologie nebo vývoje buňky, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kontakt buňky s agonistou nebo antagonistou sekvence SEQ ID NO: 2.