

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

144-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 07. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.07.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9508729**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 04. 98**
(Věstník č. 4/98)

(86) PCT číslo: **PCT/FR96/01111**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/04092**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/12
C 12 N	15/62
C 12 N	15/86
C 07 K	14/82
C 07 K	19/00
A 61 K	38/16
A 61 K	31/70
A 61 K	48/00

(71) Přihlášovatel:

RHONE-POULENC RORER S. A., Antony,
FR;

(72) Původce:

Conseiller Emmanuel, Paris, FR;
Bracco Laurent, Paris, FR;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

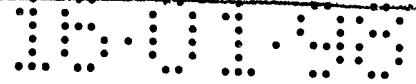
(54) Název přihlášky vynálezu:

Varianty proteinu p53 a jejich terapeutické použití

(57) Anotace:

Proteiny odvozené od produktu supresorového nádorového genu p53, který má vylepšené funkce z pohledu terapeutického použití. Týká se výhodně proteinů, které mají zvýšené funkce nádorové suprese a funkce inhibice programované buněčné smrti, zejména v souvislosti s patologickou proliferací, kde je protein p53 divokého typu inaktivní. Týká se zejména nukleových kyselin kódujících tyto molekuly, vektorů je obsahující a jejich terapeutického použití, zejména v genové terapii.

CZ 144-98 A3



Varianty proteinu p53 a jejich terapeutické použití

Oblast techniky

Předložený vynález se týká proteinů odvozených od produktu supresorového genu nádorů p53, které mají zlepšené funkce vzhledem k terapeutickému použití. Výhodně se také týká proteinů, které mají supresorové funkce nádorů a funkce induktoru programované buněčné smrti, které vynikají nad funkcemi proteinu p53 divokého typu, zejména v patologických souvislostech proliferace, ve kterých protein p53 divokého typu je neaktivní. Týká se zejména nukleových kyselin kódujících tyto molekly, vektorů je obsahující a jejich terapeutického použití, zejména v genové terapii. Produkty podle vynálezu jsou přizpůsobeny zvláště opravě funkcí p53 v patologických souvislostech zejména rakovinových.

Dosavadní stav techniky

Divoký protein p53 zasahuje do regulace buněčného cyklu a do udržování celistvosti genomu buňky. Tento protein, jehož základní funkce je být aktivátorem transkripce určitých genů, je schopný procesy ne ještě dobře definovanými blokovat buňku ve fázi G1 buněčného cyklu, tedy objevit mutace v průběhu replikace genomu a spustit určitý počet oprav DNA. V případě špatného fungování procesů oprav nebo v případě objevení velkého počtu mutačních dějů je tento protein schopen indukovat fenomén programované buněčné smrti, nazvané apoptóza.

Takovýmto způsobem protein p53 jedná jako nádorový supresor při vyloučení nepravidelně rozdělených buněk nebo buněk, jejichž genom byl poškozen.

Tato hlavní funkce proteinu p53 závisí na funkci

faktoru transkripce, jinými slovy závisí na dvou schopnostech rozpoznávat specifické sekvence na úrovni genomické DNA a získávat všeobecné vybavení transkripce.

Protein p53 obsahuje 393 aminokyselin, které definují pět funkčních domén (viz Obrázek 1):

- aktivační doména transkripce, tvořená aminokyselinami 1 až 73, schopná vázat určité faktory všeobecné vybavení transkripce jako protein TBP. Tato doména je také sídlem určitého počtu posttranslačních modifikací. Je také místem počtu interakcí proteinu p53 s počtem jiných proteinů, zejména s buněčným proteinem mdm2 nebo proteinem EBNA5 viru Epstein-Barr (EBV), schopných blokovat funkci divokého proteinu. Tato doména má sekvenci aminokyselin nazvaných PEST citlivých k proteolytické degradaci.

- DNA vazebná doména, umístěná mezi aminokyselinami 73 až 315. Konformace této centrální domény proteinu p53 řídí rozpoznání specifických sekvencí DNA proteinu p53. Tato doména je sídlem dvou typů změn určujících funkci divokého proteinu:

- (i) interakce s proteiny blokujícími funkci proteinu p53 jako antigen 'velké T' viru SV40 nebo virovými proteiny E6 virů HPV16 a HPV18 schopných vyvolat svou degradaci ubikvitinovým systémem. Tato posledně zmíněná interakce může být provedena jenom v přítomnosti buněčného proteinu E₃ (enzym E3 ubikvitinové kaskády).

- (ii) bodové mutace, které určují funkci proteinu p53 a jako jakýsi celek jsou umístěny v této oblasti.

- signál nukleární lokalizace, tvořený aminokyselinami 315 až 325, nepostradatelný ke správnému rozpoznání proteinu v místě, kde bude vykonávat svou základní funkci.

- oblast oligomerizace, tvořená aminokyselinami 325 až 355. Tato oblast 325 až 355 tvoří strukturu typu: β

skládaného listu (326 až 334) - zlom (335 až 336) - α helix α (337 až 355). Změny funkcí umístěných v této oblasti jsou zejména způsobeny interakcí divokého proteinu s různými mutovanými formami, které mohou vést k různým vlivům na funkci divokého proteinu.

- doména regulace, tvořená aminokyselinami 356 až 393 je místem určitého počtu modifikací posttranslačních (glykolizace, fosforylace, fixace RNA...), které modulují funkci proteinu p53 pozitivním nebo negativním způsobem. Tato doména hraje velmi důležitou roli v modulaci aktivity divokého proteinu.

Funkce proteinu p53 může být narušena různými způsoby.

- blokáce jeho funkce určitým počtem faktorů například antigenem 'velké T' viru SV40, proteinem EBNA5 viru Epstein-Barr nebo buněčným proteinem mdm2.

- destabilizace proteinu zvětšením jeho citlivosti k proteolýze, zejména interakcí s proteinem E6 viru lidského papilomu HPV16 a HPV18, který podporuje vstup proteinu p53 do ubikvidinového cyklu. V případě interakce mezi těmito dvěma proteiny může se provést destabilizace jen předběžnou fixací buněčného proteinu, proteinu E6ap, jehož nísto fixace je špatně známé.

- bodové mutace na úrovni genu proteinu p53

- delece jedné nebo dvou alel proteinu p53

Poslední dva typy modifikací jsou nalezeny asi v 50% různých typů rakoviny. Po této stránce mutace genu proteinu p53 zapsané v rakovinných buňkách zasahují velkou část genu kódujícího tento protein a mají za následek různé mutace funkcí tohoto proteinu. Může se uvést, že tyto mutace jsou z velké části umístěny v centrální části proteinu p53, u něhož se ví, že to je oblast kontaktu se specifickou genomickou

sekvencí proteinu p53.

To vysvětluje, proč většina mutací proteinu p53 nemá jako základní charakteristiku možnost se fixovat k sekvencím kyseliny DNA, která rozpozná divoký protein a také možnost vyvolat svou roli transkripčního faktoru. Jinak se zdá, že určité mutace mají zkušenosti nových funkcí takových, jako je aktivace určitých genů na úrovni transkripce.

Soubor těchto modifikací se dělí v současné době do třech kategorií.

- mutace řečené slabé, jejichž produkt je nefunkční protein, který v případě mutace na jedné ze dvou alel, neuděluje funkci divokého proteinu kódovaného druhou alelou. Zástupci uvedené v této kategorii jsou mutanty H273 a W248, tento posledně uvedený mutant je specifický rodinnému syndromu Li-Fraumeni hypersenzibility k rakovinným chorobám

- dominantní negativní mutace, jejichž produktem je nefunkční protein, který v případě mutace na jedné ze dvou alel interakcí s divokým proteinem je schopný blokovat funkci tohoto proteinu tvorbou směsí neaktivních oligomerů, které se již nemohou fixovat k sekvenci specifické DNA divokého proteinu. Zástupce představující tuto kategorii je mutant G281.

- dominantní onkogení mutace, jejichž produktem je protein, který je schopný jednak blokovat funkci divokého proteinu jako je mutace předchozí kategorie, a jednak podporovat špatně známými mechanismy nádorový vývoj, představující tak zesílení funkce. Zástupce představující tuto kategorii je mutant H175.

Divoký gen p53 byl použit v terapeutických genových a buněčných přístupech vzhledem k jeho antinádorovým a apoptickým vlastnostem a k jeho implikaci do počtu patologií hyperproliferativního typu. Bylo také navrženo léčit určité

hyperproliferativní patologie, zejména rakoviny, podáváním in vivo divokého genu p53, obnovou funkcí proteinu p53. Podávání může být provedeno především prostřednictvím virových vektorů, zejména adenovirů (W094/24297) nebo adenovirů (W094/06910).

Bylo také prokázáno, že vložení nukleové kyseliny kódující divoký protein p53 umožňuje opravit částečně normální regulaci buněčného růstu. Jestli tyto výsledky budou povzbudivé, účinnost takového přístupu bude omezena terapeutickou účinností proteinu p53 po přenosu a expresi in vivo v hyperproliferativních buňkách. Patologické hyperproliferativní stavy takové, jako jsou rakoviny pocházejí z poruch rovnováhy, která se ustaví v negativních nebo pozitivních regulátorech buněčného růstu. Inaktivace negativního regulátoru provedená divokým proteinem p53, objevením dominantního negativního mutantu p53 od jedné ze dvou alel a zvýšená suprese buněčného proteinu inaktivujícího p53 jako například mdm2, viz přítomnost virového inaktivátoru následovaného infekcí, tvoří nepříznivou spojitost pro terapii založenou na reintrodukcii divokého proteinu p53, který silně riskuje, že bude také inaktivován.

Je tedy obzvláště důležité upravit proteiny typu p53, které mají rozšířené terapeutické vlastnosti. Zejména bude obzvláště podstatně výhodné upravit aktivní molekuly p53, aby byly necitlivé k vlivu inaktivátorů dominantních negativních mutantů a onkogeních mutantů, jiných buněčných proteinů nebo virových proteinů například E6 HPV18 a HPV16, MDM2, EBNA5 EBV atd. vyskytujících se v nádorových buňkách.

Jisté modifikace proteinu p53 byly popsány ve vedlejších oborech. Také přihláška vynálezu W095/06661 popisuje modifikace určitých reziduí homologové oblasti proteinu p53, zejména v oblastech 343-351, 372-380 a 381-393. Tyto modifikace jsou druhořadé a nedovolují výsledným produktům, aby unikly mechanismu inaktivace proteinu p53 in

vivo. Tyto proteiny vykazují zvýšenou aktivitu vzhledem k divokému proteinu p53.

Hupp et al. (Cell Vol 71 (1992) 875) popsali derivát proteinu p53 obsahující delecí 30 reziduí C-konce (p53 Δ C-ter30). Tentokrát, jestliže tento protein zachovává schopnost vázat DNA, jeho apoptické vlastnosti nejsou prokázány. Není rezistentní k inaktivaci dominantními negativními mutanty.

Pietenpol et al. (PNAS 91 (1994) 1998) popsali chimérní molekuly odvozené od proteinu p53, zejména proteinu VP16-p53 (80-343)-GCN4. Tato molekula má schopnost vázat DNA a schopnost transfekce jasně sníženou vzhledem k divokému proteinu p53 (40%). Jinak má oblast neselektivní oligomerizace, riskující interakci s jinými buněčnými sloučeninami, a tak riskuje indukci nespecifické buněčné odpovědi. Vlastnosti rezistence k inaktivačnímu mechanismu nejsou indikovány.

Podstata vynálezu

Předložený vynález popisuje nové varianty proteinu p53, které mají zlepšené terapeutické vlastnosti. Popisuje zejména varianty přizpůsobené terapeutickému genovému použití, zejména protirakovinovému. Varianty podle vynálezu odvozené od proteinu p53 strukturální modifikací nebo strukturálními modifikacemi zachovávají aktivitu typu p53 a exprimované v hyperproliferativních buňkách předkládají alespoň jednu vlastnost zlepšenou vzhledem k proteinu p53. Může se jednat zejména o antiproliferativní aktivitu nebo/a apoptickou aktivitu. Varianty podle vynálezu mají výhodně antiproliferativní vlastnost nebo/a apoptickou vlastnost, buď specifitější hyperproliferativním buňkám nebo méně citlivé k různým změnám, kterým je podrobený divoký protein p53.

První předmět vynálezu se týká zejména varianty proteinu p53, ve které celek nebo část oblasti oligomerizace je deletována a nahrazena umělou oblastí leucinového zipu. Jak je již naznačeno, protein p53 je inaktivován jistými mutanty, zejména dominantními negativními mutanty a onkogeními mutanty, které se vyskytují v nádorové buňce. Tato inaktivace je výsledkem tvorby směsi neaktivních oligomerů interakcí mezi divokým proteinem p53 a mutantem, který se už nemůže fixovat na specifickou sekvenci rozpoznanou divokým proteinem p53. Předložený vynález popisuje nyní varianty proteinu p53 odolné vůči dominantnímu negativnímu vlivu určitých mutací, tudíž popisuje aktivní varianty v buněčné souvislosti představující jednu nebo dvě mutované alely, to je případ více než 90% lidských rakovin p53.

Ve variantách podle vynálezu celek nebo část přírodní domény oligomerizace proteinu, který nedělá rozdíl mezi divokými formami a mutanty, je nahrazen ekvivalentní doménou mající schopnost specifické oligomerizace. Tato modifikace je provedena za použití umělého leucinového zipu optimalizovaného pro tvorbu dimerů. Molekuly podle vynálezu obsahující takový umělý leucinový zip jsou zejména výhodné, protože tvoří oligomery jedině s dalšími molekulami nesoucími stejný leucinový zip. Netvoří tak oligomery s dominantními negativními mutanty nebo onkogeními mutanty proteinu p53 schopnými je inaktivovat. Netvoří ani oligomery s dalšími buněčnými proteiny nesoucími doménu oligomerizace, schopné je tak inaktivovat nebo indukovat nežádoucí vlivy. Mohou tvořit jen homooligomery, mají tak důležitou selektivitu zajišťující lepší aktivitu v souvislosti s hyperproliferativními patologiemi.

Podle předloženého vynálezu umělá doména leucinového zipu je tak výhodně doménou nepřítomnou v přírodním stavu zajišťující oligomerizační selektivitu. Doména oligomerizace je reprezentovaná sekvencí SEQ ID n°1.

V upřednostněném způsobu provedení vynálezu varianty zahrnují delecí celku nebo části domény oligomerizace a celku nebo části regulační domény. Jak je již dříve naznačeno, doména oligomerizace je umístěna mezi rezidui 325-355 včetně a regulační doména mezi rezidui 365-393 včetně. Tento typ varianty je docela výhodný, protože je úplně nebo částečně bez účinků negativní regulace provedené prostřednictvím části C-konce (aa 365-393). Tyto varianty tvoří proteiny potencionálně podstatně aktivní, představující aktivitu nemodulovatelnou a případně zvětšenou. Oblast regulace je úplně výhodně zrušena. Upřednostněné varianty podle vynálezu zahrnují delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 326 nebo 337.

Příklady zprostředkovatelů použitých pro konstrukci těchto variant jsou zejména:

-pEC107 (75-325-Iz) mající delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 326 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1.

-pEC110 (75-336-Iz) mající delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 337 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1.

Podle způsobu provedení je výhodně ve variantách podle vynálezu cystein v pozici 182 proteinu p53 nahrazen histidinem. Tato mutace dovolu je výhodně zvýšit afinitu varianty pro specifické nukleotidové sekvence vázání. Vložení této doplňkové modifikace dovolu je tedy získat molekulu mající větší transaktivační potenciál.

Přesné příklady konstrukcí tvořených pro přípravu variant podle vynálezu kombinující tyto různé modifikace jsou zejména:

- pEC139 (75-325(H182)-Iz) mající delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 336 nahrazenou umělou doménou

oligomerizace sekvence SEQ ID n°1 a histidinem v poloze 182.

- pEC140 (75-336(H182)-Iz) mající delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 337 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1 a histidinem v poloze 182.

Výhodně je ve variantách podle vynálezu celek nebo část transaktivační domény deletován a nahrazen heterologní transaktivační doménou. Již dříve bylo naznačeno, že transaktivační funkce proteinu p53 jsou podstatné pro svou supresorovou aktivitu nádoru nebo induktoru apoptozy. Aby se zvýšil terapeutický potenciál variant podle vynálezu je zejména výhodné nahradit přírodní transaktivační doménu heterologní transaktivační doménou. Tyto varianty mají také počet nevýhod. Mají, jak se dalo očekávat, vysokou transaktivační aktivitu. Ale jsou také bez citlivosti k vlivům negativní regulace vykonanou prostředníkem části N-konce (aa 1-73). Vskutku tato oblast obsahuje sekvenci PEST odpovědnou za svou proteolytickou degradaci. Substituce této oblasti heterologní transaktivační doménou bez sekvencí PEST dovoluje snížit tuto negativní regulaci. Tyto varianty jsou také charakterizovány snížením, dokonce i suprese, každé interakce s proteinem E6 viru lidského palindromu (HPV), který je schopný indukovat jejich degradaci. Jsou také méně citlivé k interakcím s dalšími buněčnými proteiny takovými, jako jsou MDM2 a EBNA, které určují aktivitu divokého proteinu p53. Varianty takto získané mají tak zvýšenou stabilitu. Suprese citlivých oblastí k negativní regulaci (regulační a transaktivační doména) zejména způsobuje to, že molekuly, které už nejsou cílem proteinů indukujících jejich proteolýzu nebo jejich inaktivaci.

Výhodně je ve variantách podle vynálezu transaktivační doména odstraněna delecí reziduí 1 až 74. Přechodné konstrukce použité pro realizaci takových molekul jsou zejména pEC107 (75-325-Iz), pEC110 (75-336-Iz), pEC139

(75-325(H182)-Iz) a pEC140 (75-336(H182)-Iz).

Podle prvního způsobu realizace heterologní transaktivační doména je transaktivační doména VP16. Je výhodně složená z reziduí 411 až 490 V916, jejichž sekvence je dána SEQ ID n°2. Přesné příklady variant podle vynálezu kombinující tyto různé modifikace jsou zejména:

- pEC114 (VP16-75-325-Iz) mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74, nahrazenou transaktivační doménou VP16 sekvence SEQ ID n°2 a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 326 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1. Úplná sekvence varianty pEC114 je reprezentována SEQ ID n°25.

- pEC116 (VP16-75-336-Iz) mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74, nahrazenou transaktivační doménou VP16 sekvence SEQ ID n°2 a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 337 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1. Úplná sekvence varianty pEC114 je reprezentována SEQ ID n°26.

- pEC147 (VP16-75-325(H182)-Iz) mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74, nahrazenou transaktivační doménou VP16 sekvence SEQ ID n°2 a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 326 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1, a histidin v poloze 182.

- pEC149 (VP16-75-336(H182)-Iz) mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74, nahrazenou transaktivační doménou VP16 sekvence SEQ ID n°2 a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 337 nahrazenou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1, a histidin v poloze 182.

Vzhledem k dříve zmíněným modifikacím varianty podle vynálezu mají také vlastnosti 'vražedné', které vedou k

zastavení buněčného cyklu a apoptózy potencionálně zvýšené. Kombinace zmíněných modifikací, zahrnující přítomnost selektivní domény oligomerizace a transaktivační schopnost zvýšenou substitucí původní domény a přítomností histidinu v poloze 182 udělují vskutku variantám podle vynálezu terapeutické potenciály jasně zlepšené. Mimoto varianty podle vynálezu umožňují vyhnout se určitým mutacím (dominantním onkogením). Zesílení funkce určitých mutací proteinu p53 jsou ještě špatně definovány na úrovni jejich mechanismů, na úrovni domén proteinu p53. Je tedy silně pravděpodobné, že tyto nové funkce budou záviset na kombinování s určitým partnerskými molekulovými efektoři. Eliminace implikovaných domén z těchto interakcí, jejichž transformační vlastnosti byly prokázány ve smyslu popsaných molekul v předložené přihlášce vynálezu, jsou takové povahy, že zabraňují zvýšení onkogeních funkcí. Také mutace, které se objevují náhodným způsobem během přípravy klinických částí plazmidů kódujících popsané polypeptidy nebo během produkce klinických částí virových nebo chemických vektorů kódujících tyto stejné polypeptidy nevytvářejí podpopulaci onkogeních molekul.

Vzhledem k supresi určitých domén proteinu p53 nezbytných pro fixaci určitých inhibičních molekul své funkce, varianty podle vynálezu mají také terapeutickou vyšší a stabilnější aktivitu. Existence cizích motivů v různých konstrukcích podle vynálezu (např. myší protein AS, umělá doména oligomerizace atd.) je schopná zahájit imunitní reakci během smrti transfektovaných buněk v extracelulárním prostředí těchto různých fragmentů, zvyšujících tak schopnost imunitního systému k boji proti nádorovým buňkám.

Podle jiného způsobu provedení heterologní transaktivační doména je transaktivační doména aktivní přednostně v transformovaných buňkách a ne ve zdravých příbuzných buňkách. Předložený vynález popisuje vskutku také molekuly jejichž funkce se vyskytuje zejména v

transformovaných buňkách a ne ve zdravých příbuzných buňkách. Zdá se, že exprese exogenu divokého proteinu p53 uprostřed buněčného dělení zahrnující endogen divokého proteinu p53 má malý nebo žádný vliv na životaschopnost, je nicméně výhodná možnost upravit protein, který bude nefunkční uprostřed cílové buňky. Tato specifická nádorových buněk oproti normálním buňkám je v současné době hodně zpracovaná na úrovni specifickosti cílového virového vektoru nebo na úrovni koncepce specifického expresního systému. Předložený vynález nyní popisuje deriváty proteinu p53, jehož jedna z funkčních domén je v nepřítomnosti buněčného aktivátoru přítomná, zejména v transformovaných buňkách.

Jiný předmět předloženého vynálezu se týká varianty proteinu p53 aktivní přednostně v transformovaných buněk, ve kterých alespoň jedna z funkčních domén proteinu p53 je deletována celá nebo z části a je nahrazena heterologní doménou aktivní především v transformovaných buňkách. Funkční doména proteinu p53 je doména transaktivační. Předmět zejména upřednostňovaný podle vynálezu se týká varianty proteinu p53 aktivní přednostně v transformovaných buňkách, ve kterých přírodní transaktivační doména je deletována celá nebo z části a je nahrazena transaktivační doménou aktivní především v transformovaných buňkách. Přírodní transaktivační doména je deletována supresí reziduí 1 až 74 včetně proteinu p53.

Předložený vynález se týká zejména variant proteinu p53, které jsou specificky funkční v přítomnosti onkogeního proteinu Ras nebo mutantu proteinu p53. Tyto molekuly jsou získány zejména nahrazením transaktivační domény divokého proteinu p53 proteinovou doménou schopnou specificky vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex přítomný v transformované buňce.

Proteinová doména schopná specificky vázat transkripční transaktivátor nebo transkripční transaktivátorový komplex přítomný v molekulách vynálezu může být různého typu. Může se

jednat zejména o doménu oligomazace v případě, kde transaktivátor nebo transaktivační komplex zahrnuje zejména jednu takovou doménu. Může se také jednat o syntetickou doménu nebo známou přírodní doménu, která by interagovala s výše uvedeným transaktivátorem nebo transaktivačním komplexem. Může se také jednat o protilátky, buď fragment nebo derivát protilátky řízený proti transaktivátoru nebo transaktivačnímu komplexu.

Heterologní doména je tvořena protilátkou, buď fragmentem nebo derivátem protilátky. Fragments nebo deriváty protilátek jsou například fragmenty Fab nebo F(ab)'₂, oblasti VH nebo VL protilátky nebo také protilátky jednoduchého řetězce (ScFv) obsahující oblast VH vázanou k oblasti VL ramenem. Konstrukce sekvencí nukleových kyselin kódujících takovéto protilátky modifikované podle vynálezu byly popsány například v US4,946,778 nebo v přihláškách vynálezu WO94/02610, WO94/29446.

Upřednostňovaná konstrukce podle vynálezu zahrnuje protilátku ScFv řízenou proti mutantu proteinu p53. Tyto mutanty se objevují v transformovaných buňkách a mají transaktivační doménu. Jejich získávání variantou podle vynálezu tvoří chimérní molekulu aktivní zejména v transformovaných buňkách.

Podle jiného upřednostňovaného způsobu, protilátka ScFv je řízená proti transaktivačnímu komplexu, tudíž komplexu mezi cílovou molekulou přítomnou zvláště v transformovaných buňkách, ale bez transkripční aktivity transaktivátoru (například onkogení ras) a molekulou nesoucí transaktivační doménu. Tato molekula výhodně zahrnuje transaktivační doménu a doménu selektivně vázanou k výše uvedené buněčné molekule (například ScFv anti-ras). Fixace této molekuly dovoluje tvorbu binárního transkripčního komplexu transaktivátoru, který vyvolává komplex, který je tedy získán variantou podle

vynálezu.

Všechny další typy modifikací vedoucí k těmto specifickým aktivitám mohou být použity v rámci předloženého vynálezu stejně jako každá transaktivační doména specifická pro určitý typ buňky.

Tyto selektivní varianty obsahují výhodně doplňkové modifikace v části C-konce, jak je již naznačeno, pro zlepšení jejich vlastností. Obsahují také výhodně delecí celku nebo části domény oligomerizace, která může být nahrazena celou heterologní doménou oligomerizace. Jedná se především o umělou doménu oligomerizace takovou, jaká je již definována.

Přesné příklady variant podle vynálezu aktivních především v transformovaných buňkách jsou zejména:

- ScFv.antip53*-75-325-Iz mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou doménou schopnou specificky vázat mutant proteinu p53 přítomný v transformované buňce a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 326, substituovanou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1.

- ScFv.antip53*-75-325(H182)-Iz obsahující zvláště mutaci His 182.

- ScFv.antip53*-75-336-Iz mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou doménou schopnou specificky vázat mutant proteinu p53 přítomný v transformované buňce a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 337, substituovanou umělou doménou oligomerizace sekvence SEQ ID n°1.

- ScFv.antip53*-75-336(H182)-Iz obsahující zvláště mutaci His 182.

- ScFv.antip53*-75-393 mající delecí části N-konce

proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou doménou schopnou specificky vázat mutant proteinu p53 přítomný v transformované buňce.

- ScFv.antip53*-75-393(H182)-Iz obsahující zvláště histidin v poloze 182.

ScFv.antip53*-75-367 mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou doménou schopnou specificky vázat mutant proteinu p53 přítomný v transformované buňce a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 368.

- ScFv.antip53*-75-367(H182) obsahující zvláště histidin v poloze 182.

- ScFv.antip53*-75-AS mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou doménou schopnou specificky vázat mutant proteinu p53 přítomný v transformované buňce a delecí části C-konce proteinu p53 od rezidua 367, přidanou k 19 aminokyselin sekvence SEQ ID n°3.

- ScFv.antip53*-75-AS(H182) obsahující zvláště histidin v poloze 182.

Termín aktivní naznačuje, že tyto varianty zkoušejí svou aktivitu zejména až když jsou exprimovány v transformovaných buňkách. Zbytková aktivita může přece jen být v buňkách netransformovaných, ale nižší než v buňkách transformovaných.

Jiný předmět předloženého vynálezu se týká varianty proteinu p53 zahrnující delecí na C-konci od rezidua 367, sloučenou se sekvencí SEQ ID n°3 (AS). Tato sekvence odpovídá 19 posledním aminokyselin produktu alternativnímu myšimu proteinu p53. Tato varianta představuje tedy modifikaci domény oligomerizace založenou na proteinu popsáném u krys jako varianta alternativní divokému proteinu, ve kterém 27

aminokyselin C-konce je nahrazeno 19 různými aminokyselinami. Tato varianta má afinitu pro specifické sekvence vazby k DNA potenciálně zvýšenou.

Tato varianta zahrnuje výhodně modifikace v části N-konce, jak je již naznačeno, pro zlepšení jejích vlastností. Obsahuje výhodně delecí celé nebo části transaktivační domény, která může být nahrazena heterologní transaktivační doménou. Jedná se zejména o transaktivační doménu odvozenou od proteinu VP16 nebo proteinovou doménou schopnou specificky vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex přítomný v transformované buňce. Mimoto reziduum 182 proteinu p53 je výhodně nahrazeno histidinem.

Přesné příklady typu variant podle vynálezu jsou zejména:

- ScFv.antip53*-75-AS již dříve popsána,
- pEC143(VP16-75-AS) mající delecí části N-konce proteinu p53 obsahující rezidua 1 až 74 substituovanou proteinovou transaktivační doménou VP16 sekvence SEQ ID n°2 a delecí části C-konce od rezidua 367 přidanou k 19 aminokyselinám sekvence SEQ ID n°3. Kompletní sekvence varianty pEC143 je představena SEQ ID n°28.
- ScFv.antip53*-75-AS(H182) již dříve popsána,
- pEC153(VP16-75-AS(H182)) odpovídá pEC143 s histidinem v poloze 182.

Podle všeobecnějšího způsobu se vynález týká všech chimérických proteinů zahrnujících transaktivační doménu, doménu DNA vazebnou, jadernou rozpoznávací doménu a doménu oligomerizace, ve kterých DNA vazebné domény a jaderné rozpoznávací domény jsou tvořeny aminokyselinami 75 až 325 lidského divokého proteinu p53 (SEQ ID n°4). Předkladatel vskutku ukázal, že tato oblast proteinu p53 spojená s transaktivační doménami přizpůsobenými doménám oligomerizace

umožňuje tvorbu molekul typu p53 mající vlastnosti zejména výhodné v oblasti stability, odolnosti k negativním vlivům mutantů proteinu p53 a citlivosti k inaktivaci různými buněčnými faktory.

Podle varianty DNA vazebná doména a jaderná rozpoznávací doména jsou tvořeny aminokyselinami 75 až 336 divokého lidského proteinu p53 (SEQ ID n°5).

Chiméřní proteiny podle předloženého vynálezu mohou zahrnovat různé typy transaktivačních domén. Může se jednat o transaktivační doménu proteinu p53. Může se jednat zejména o heterologní transaktivační doménu vybranou například mezi transaktivační doménou VP16 nebo proteinovou doménou schopnou specificky vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex přítomný v transformované buňce.

Co se týče domény oligomerizace, může se jednat především o umělou doménu, tedy specifickou, například umělý leucinový zip, zejména sekvence SEQ ID n°1.

Chiméřní proteiny podle předloženého vynálezu mohou mimoto obsahovat histidin v poloze 182.

Přesné příklady chiméřních proteinů takových, jaké jsou popsány v předložené přihlášce vynálezu jsou zejména pEC114, pEC116, pEC147 a pEC149.

Předložený vynález se týká také každé nukleové kyseliny kódující vyřiantu nebo chiméřní protein takových, jaké jsou již definovány.

Nukleová kyselina podle vynálezu může být kyselina ribonukleová (RNA) nebo deoxyribonukleová (DNA). Mimoto se může jednat o komplementární cDNA případně obsahující jeden nebo více intronů genu p53. Může být lidského původu, zvířecího, virového, syntetického nebo semisyntetického. Může být získána různými způsoby, zejména chemickou syntézou za použití sekvencí uvedených v přihlášce vynálezu a například

syntetizátorem nukleových kyselin. Může být získána tříděním bank pomocí specifických sond, zejména takových, jaké jsou popsány v přihlášce vynálezu. Může být také získána smíšenými technikami zahrnujícími chemické modifikace (elongace, delece, substituce atd.) tříděných sekvencí z bank. Všeobecným způsobem mohou být nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu připraveny podle všech odborníky známých technik.

Nukleová kyselina podle předloženého vynálezu je cDNA nebo RNA.

Nukleová kyselina podle předloženého vynálezu je výhodně vybrána mezi:

(a) celá nebo část sekvencí SEQ ID n°25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33 a 34 nebo jejich komplementární vlákno,

(b) každá sekvence hybridující se sekvencemi (a) kódující derivát podle vynálezu,

(c) varianty (a) a (b) vyplývající z degenerace genetického kódu.

Jak je již naznačeno, předkladatel nyní vytvořil nové sekvence nukleové kyseliny kódující různé polypeptidy proteinu p53 mající antiproliferativní vlastnosti a apoptické docela význačné. Tyto nukleové kyseliny mohou být použity jako terapeutické agens, za účelem vyvolat v derivovaných buňkách podle vynálezu schopnost zničit nebo opravit buněčné disfunkce. V tomto ohledu předložený vynález se týká zejména kazet exprese obsahujících nukleovou kyselinu takovou jaká je již definována, promotor umožňující její expresi a terminační signál transkripce. Promotor je výhodně vybrán mezi funkčními promotory v savčích buňkách především lidských. Jedná se zejména o promotor umožňující expresi nukleové kyseliny v hyperproliferativní buňce (např. karcenogéní) V tomto oledu mohou být použity různé promotory. Může se jednat například o

vlastní promotor genu p53. Může se jednat zejména o oblasti různého původu (odpovědné za expresi dalších proteinů nebo syntetických proteinů). Může se jednat o každý promotor nebo odvozenou sekvenci stimulující nebo potlačující transkripci genu specificky nebo nespecificky, indukovatelně nebo neindukovatelně, silně nebo slabě. Mohou se uvést zejména sekvence promotory eukariontních genů nebo genů virových. Například se může jednat o sekvence promotorů pocházejících z genomu cílové buňky. Mezi eukariontními promotory se mohou použít zejména ubikvitinové promotory (promotor genů HPRT, PGK, α -aktin, tubulin atd.), vláknité promotory (promotor genů GFAP, desmin, vimentin, keratin atd.), promotory terapeutických genů (například promotor genů MDR, CFTR, Taktor VIII, ApoAI atd.), specifické promotory tkání (promotor genu pyruvát-kinasy, vilinu, proteinu střevní vazby mastných kyselin, α -aktin hladkého svalstva atd.) nebo také promotory odpovídající podnětu (receptor steroidních hormonů, receptor kyseliny retinové atd.). Může se jednat o sekvence promotorů genů E1A a MLP adenoviru, ranný promotor CMV nebo také promotor LTR RSV atd. Mimoto tyto oblasti promotorů mohou být modifikovány přidavkem aktivačních sekvencí, sekvencí regulačních nebo sekvencí umožňující tkáňově specifickou expresi nebo sekvencí majoritní.

Předložený vynález nabízí nyní nové terapeutické agens umožňující svými antiproliferativními vlastnostmi nebo/a apoptickými vlastnostmi interferovat s počtem disfunkčních buněk. Za tímto cílem nukleové kyseliny nebo kazety podle vynálezu mohou být injektovány na úrovni místa ošetření nebo inkubovány přímo s buňkami určenými ke zničení nebo ošetření. Bylo popsáno, že nukleové kyseliny nus mohou penetrovat do buněk bez zvláštního vektoru. Nicméně v rámci předloženého vynálezu se upřednostňuje použití vektoru podávání umožňující zvýšit (i) účinnost buněčné penetrace, (ii) cílení (iii) stabilitu extra a intracelulární.

Podle provedení nukleová kyselina nebo kazeta zejména upřednostněná předloženým vynálezem je zahrnuta do vektoru. Použitý vektor může být chemického původu (lipozom, peptidový komplex, lipidy nebo kationické polymery atd.), virového původu (retrovirus, adenovirus, oparový virus, AAV, virus neštovic atd.) nebo plazmatického původu.

Použití virových vektorů spočívá na přirozených vlastnostech transfekce virů. Je možné použít například adenoviry, oparové viry, retroviry a viry AAV. Tyto vektory se jeví zejména vykonané z hlediska transfekce. Po této stránce upřednostněný předmět podle vynálezu spočívá v defektních rekombinantních retrovirech, jejichž genom obsahuje nukleovou kyselinu takovou, jaká je již dříve definovaná. Jiný předmět předloženého vynálezu spočívá zejména v defektních rekombinantních adenovirech, jejichž genom obsahuje nukleovou kyselinu takovou, jaká je již dříve definovaná.

Vektor podle předloženého vynálezu může zejména být nevirový agens schopný podporovat přenos a expresi nukleových kyselin v eukaryontních buňkách. Vektory chemické nebo biochemické, syntetické nebo přírodní, představují zajímavou alternativu přírodním virům, zejména z příjemných důvodů, bezpečnosti a zejména nepřítomnosti teoretické limity, která se týká velikosti DNA použité k transfekci. Tyto syntetické vektory mají dvě základní funkce, zkompaktnit nukleovou kyselinu pro transfekci a podporovat svou buněčnou fixaci, rovněž jako podporovat svůj přechod skrz plazmovou membránu a popřípadě dvě nukleární membrány. Pro potlačení polyanionické povahy nukleových kyselin mají nevirové vektory všechny náboje polykationické.

Nukleová kyselina nebo vektor použitý v předloženém vynálezu mohou být formulovány vzhledem k podávání, a to způsobem topikálním, orálním, parenterálním, intranasálním, nitrožilně, intramuskulárně, podkožně, intraokulárně,

transdermatologicky atd. Nukleová kyselina nebo vektor jsou výhodně použity v injektovatelné formě. Mohou to být směsi vehikula farmaceuticky přijatelného pro injektovatelnou formu, zejména pro přímou injektaci na úrovni místa ošetření. Může se jednat zejména o sterilní roztoky, izotonické nebo suché látky, především lyofilizované, které po přidání sterilní vody nebo fyziologického séra podle okolnosti, umožňují injektovatelnou formu. Přímé injektování nukleové kyseliny do nádoru pacienta je zajímavé, protože to dovoluje soustředit terapeutický vliv na úrovni postižené tkáně. Dávky nukleové kyseliny mohou být uzpůsobeny vzhledem k různým parametrům, zejména vzhledem ke genu, vektoru, způsobu použitého podávání, patologii nebo také vzhledem k délce léčení.

Vynález se týká zejména všech farmaceutických kompozic, které obsahují alespoň jednu nukleovou kyselinu takovou, jaká je již popsána.

Týká se zejména všech farmaceutických kompozic, které obsahují alespoň jeden vektor takový, jaký je již popsán.

Týká se také všech farmaceutických kompozic, které obsahují alespoň jednu variantu proteinu p53 takovou, jaká je již popsána.

Vzhledem k antiproliferativním vlastnostem farmaceutických kompozic podle vynálezu, jsou tyto kompozice přizpůsobeny zejména pro léčení hyperproliferativních chorob především rakovin a restenosy. Předložený vynález předkládá také metodu účinnou především pro destrukci buněk, zejména hyperproliferativních. Tato metoda může být použita in vitro nebo ex vivo. Ex vivo spočívá zejména v inkubaci buněk v přítomnosti jedné nebo více nukleových kyselin (nebo vektoru, kazety nebo přímo derivátu). Metoda použitá in vivo spočívá v podávání organismu aktivního množství vektoru (nebo kazety) podle vynálezu přímo na úrovni místa ošetření (zejména

ošetření nádoru). Po této stránce se vynález týká zejména metody destrukce hyperproliferativních buněk zkontaktováním těchto buněk nebo části z nich s nukleovou kyselinou, již dříve definovanou.

Předložený vynález je výhodně použit in vivo pro destrukci hyperproliferativních buněk (tj. v nenormální proliferaci). Je tak aplikovatelný pro destrukci nádorových buněk nebo buněk hladkého svalstva vaskulární stěny (resténosa). Je přizpůsobený zejména léčení rakovin, ve kterých je přítomný mutant p53. Kupříkladu se mohou citovat adenokarcinomy tračnicku, rakoviny štítné žlázy, karcinom plic, leukémie míchy, rakoviny konečnicku, rakoviny prsu, rakoviny plic, rakoviny žaludku, rakoviny jícnu, lymfomy B, rakoviny vaječnicků, rakoviny močového měchýře, glioblastomy, hepatokarcinomy, rakoviny kostí, kůže, pankreasu, rakoviny ledvin a prostaty, rakoviny jícnu, rakoviny hrtanu, rakoviny hlavy a krku, rakoviny genitálií HPV pozitivní, rakoviny nosohltanu EBV pozitivní, rakoviny, ve kterých buněčný protein mdm2 je silně exprimován atd.

Varianty podle vynálezu jsou zejména účinné pro léčení rakovin, ve kterých protein MDM2 je ktomě toho silně exprimován, stejně jako pro léčení rakovin spojených s virem HPV například rakovin genitálií HPV pozitivních.

Následující obrázky a příklady blíže ilustrují vynález, aniž by však v jakémkoliv směru omezovaly jeho rozsah.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Funkční domény divokého proteinu p53. TA: Aktivační doména transkripce, DNB: DNA vazebná doména, NLS: signál nukleární lokalizace, OL: doména oligomerizace, REG: doména regulace.

Obrázek 2: Konstrukce cDNA kódující formu AS proteinu

p53.

Obrázek 3: Klonování cDNA kódující konstrukce pEC104, pEC106, pEC131, pEC132 a pEC133 a kódující jejich variantu H182.

Obrázek 4: Konstrukce variant pEC107, pEC110, pEC139 a pEC140 fúzí s umělou doménou oligomerizace.

Obrázek 5: Konstrukce variant pEC114, pEC116, pEC141, pEC143, pEC145, pEC147, pEC149, pEC151, pEC153 a pEC155.

Obrázek 6: Rozpoznání sekvencí specifické dvouvláknové DNA hybridními molekulami vynálezu.

Pokus zpoždění na gelu: soutěž mezi HisV325 a divokým p53. sloupec 1: inkubace v nepřítomnosti HisV325 a divokého p53, sloupec 2: 30 ng divokého p53, sloupec 3: detto 2 + pAb421, sloupec 4: 30 ng HisV325, sloupec 5: detto 4 + pAb421, sloupec 6: 30 ng HisV325 + 30 ng divokého p53, sloupec 7: detto 6 + pAb421, sloupec 8: 30 ng HisV325 + 15 ng divokého p53, sloupec 9: detto 8 + pAb421, sloupec 10: 30 ng HisV325 + 7,5 ng divokého p53, sloupec 11: detto 10 + pAb421, sloupec 12: 30 ng HisV325 + 4,5 ng divokého p53, sloupec 13: detto 12 + pAb421, sloupec 14: 30 ng HisV325 + 3 ng divokého p53, slopec 15: detto 14 + pAAb421.

Obrázek 7: Transaktivační aktivita divokého proteinu p53 a varianty AS, V-325 a V-336.

Obrázek 8: Transaktivační aktivita divokého proteinu p53 a varianty V-325, V-336 a V-343.

Obrázek 9: Expres variant vynálezu v buňkách SAOS-2.

Obrázek 10: Indukce genů hdm2 a WAF1 v buňkách EB, EB-1 a EB-V325.

Obrázek 11: Vliv proteinu E6 na transaktivační funkci proteinu p53 a variant vynálezu v buňkách SAOS-2. Množství

vektorů CMV-konstrukce = 100 ng.

Obrázek 12: Vliv proteinu E6 na transaktivační funkci proteinu p53 a variant vynálezu v buňkách HeLa.

Obrázek 13: Citlivost divokého proteinu p53 a variant vynálezu k degradaci indukované proteinem E6.

Obrázek 14: Vliv dominantního negativního mutantu proteinu p53 H175 na transaktivační funkci variant vynálezu. Množství vektorů CMV-konstrukce = 100 ng.

Obrázek 15: Vliv proteinu hdm2 na transaktivační funkci proteinu p53 a variant vynálezu v buňkách SAOS-2. Množství vektorů CMV-konstrukce = 100 ng.

Obrázek 16: Vliv divokých proteinů p53 a V-325 na růst buněk silně exprimující protein hdm2.

Obrázek 17: Indukce apoptózy divokými proteiny p53 a V-325.

Obrázek 18: Kinetická indukce apoptózy v buňkách EB, EB-1 a EB-V325.

Příklady provedení vynálezu

Příklad A. Konstrukce různých nukleotidových fragmentů nezbytných pro realizaci genů kódujících varianty proteinu p53

A1. Konstrukce cDNA kódující divoký lidský protein p53

Gen lidského proteinu p53 byl klonován řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA banky lidské placenty (Clontech) za použití oligonukleotidů 5'-1 a 3'-393.

Oligonukleotid 5'-1 (SEQ ID n°6):

ATGGAGGAGCCGCAG

Oligonukleotid 3'-393 (SEQ ID n°7):

GGCGCCGCGATATCGATTCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Produkt byl potom klonován přímo po PCR do vektoru pCRII (Invitrogen).

A2. Konstrukce cDNA kódující formu AS proteinu p53

Forma AS proteinu p53 obsahuje fragment kódující aminokyseliny 1 až 366 lidského proteinu p53 připojený k 19 posledním aminokyselinám produktu alternativního sestřihu myšího proteinu p53.

Forma AS proteinu p53 byla získána ve dvou etapách:

-amplifikace PCR fragmentu kódující aminokyseliny 1 až 367 proteinu p53 za použití oligonukleotidů 5'-1 (viz příklad A1) a 3'-367,

Oligonukleotid 3'-367 (SEQ ID n°8):

GGCGCCGCGATATCGATTCATCAGCTCGAGTGAGC

Fragment PCR takto získaný byl pak klonován do vektoru pCRII (Invitrogen). Takto získaný fragment má rozpoznávací

místo pro restriční enzym Xho I (fragment 1-367).

-oligonukleotidy 5'-AS1, 5'-AS2, 3'-AS1 a 3'AS2 byly fosforylovány potom společně hybridovány za účelem tvorby fragmentu kódujícího posledních 19 aminokyselin produktu alternativního sestřihu myšního proteinu p53.

5'-AS1 (SEQ ID n°9):

TCGAGCCTGCAGCCTAGAGCCTTCCAAGCCCTCATGAAGGAGG

5'-AS2 (SEQ ID n°10):

AAAGCCCAAACCTGCTGATGAATCGATATCGC

3'-AS1 (SEQ ID n°11):

TGAGGGCTTGGAAGGCTCTAGGCTGCAGGC

3'-AS2 (SEQ ID n°12):

GGCCGCGATATCGATTCATCAGCAGTTTGGGCTTTCCTCCTTCA

Tento fragment byl pak vložen na úrovni místa Xho I fragmentu 1-367 (viz Obrázek 2). Takto vytvořený gen kóduje variantu lidského produktu alternativního sestřihu myšního proteinu p53 (AS).

Takto modifikovaná sekvence je následující:

	364	367		386
393				
	I	I		I
I				
p53:-	-AHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSZ			
AS:-	-AHSSLQPRAFQALMKEESPNCZZ			
367:-	-AHSSZZ			

A3. Konstrukce cDNA kódující různé fragmenty proteinu p53 nesoucí DNA vazebnou doménu.

Tento příklad popisuje konstrukci různých cDNA kódující různé fragmenty lidského proteinu p53 nesoucí celek nebo část DNA vazebné domény proteinu p53. Tyto fragmenty jsou pak použity v konstrukci variant proteinu p53. Byly získány amplifikační reakcí polymerasou na matricích popsanych v příkladu A1 a A2 prostřednictvím různých oligonukleotidů. Amplifikační reakce byly provedeny za podmínek popsanych v příkladu A4.1.

A3.1. Konstrukce cDNA kódující oblast 75-325 proteinu p53 a jeho derivát H182

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 325 divokého lidského proteinu p53 (75-325).

Tato cDNA byla získána řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 a 3'-325:

5'-75 (SEQ ID n°13):

GGGAAGCTTGGGCCGGGTCGACCTGCACCAGCAGCTCCT

3'-325 (SEQ ID n°14):

GGCGGCCGCGGATCCCCATCCAGTGGTTTCTT

Derivát tohoto fragmentu nesoucí bodovou mutaci na aminokyselině 182 lidského proteinu p53 (cystein -> histidin) byl získán mutagenezí řízenou prostřednictvím soupravy Amersham za použití oligonukleotidu H182:

Oligonukleotid H182 3' (SEQ ID n°15):

ATCTGAATGGCGCTC

Tento fragment byl označen 75-325(H182).

A3.2. Konstrukce cDNA kódující oblast 75-336 proteinu p53 a jeho derivát H182

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 336 divokého lidského proteinu p53 (75-336).

Tato cDNA byla získána řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 (SEQ ID n°13) a 3'-336:

3'-336 (SEQ ID n°16):

GGCGGCCGCGGATCCTCACGCCACGGATCTG

Derivát tohoto fragmentu nesoucí bodovou mutaci na aminokyselině 182 lidského proteinu p53 (cystein -> histidin) byl získán mutagenezí řízenou prostřednictvím soupravy Amersham za použití oligonukleotidu H182 (SEQ ID n°15). Tento fragment byl označen 75-336(H182).

A3.3. Konstrukce cDNA kódující oblast 75-343 proteinu p53

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 343 divokého lidského proteinu p53 (75-343).

Tato cDNA byla získána řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 (SEQ ID n°13) a 3'-343:

3'-343 (SEQ ID n°35):

CGGATCCTCTCGGAACATCTCGAA

A3.4. Konstrukce cDNA kódující oblast 75-367 proteinu p53 a jeho derivát H182

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 367 divokého lidského proteinu p53 (75-367).

Tento fragment byl získán řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 (SEQ ID n°13) a 3'-367 (SEQ ID n°8).

Takto získaný fragment obsahuje rozpoznávací místo endonukleasou Xho I (75-367).

Derivát tohoto fragmentu nesoucí bodovou mutaci na aminokyselině 182 lidského proteinu p53 (cystein -> histidin) byl získán mutagenezí řízenou prostřednictvím soupravy Amersham za použití oligonukleotidu H182 (SEQ ID n°15). Tento fragment byl označen 75-367(H182).

A3.5. Konstrukce cDNA kódující fragment 75-AS a jeho derivát H182

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 366 divokého lidského proteinu p53 (75-366) přidané k 19 posledním aminokyselinám produktu alternativního sestřihu myšního proteinu p53.

Tento fragment byl získán řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA fragmentu AS (popsáno v příkladu A2) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 (SEQ ID n°13) a 3'-AS2 (SEQ ID n°12).

Derivát tohoto fragmentu nesoucí bodovou mutaci na aminokyselině 182 lidského proteinu p53 (cystein -> histidin) byl získán mutagenezí řízenou prostřednictvím soupravy Amersham za použití oligonukleotidu H182 (SEQ ID n°15). Tento fragment byl označen 75-AS(H182).

A3.6. Konstrukce cDNA kódující fragment 75-393 proteinu

p53 a jeho derivát H182

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 75 až 393 lidského proteinu p53 (75-393). Tento fragment byl získán řetězovou amplifikační reakcí (PCR) na DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1) s následujícími oligonukleotidy 5'-75 (SEQ ID n°13) a 3'-393 (SEQ ID n°7).

Derivát tohoto fragmentu nesoucí bodovou mutaci na aminokyselině 182 lidského proteinu p53 (cystein -> histidin) byl získán mutagenezí řízenou prostřednictvím soupravy Amersham za použití oligonukleotidu H182 (SEQ ID n°15). Tento fragment byl označen 75-393(H182).

A4. Konstrukce cDNA kódující různé fragmenty nesoucí aktivační doménu transkripce (transaktivační doména).

Tento příklad popisuje konstrukci různých cDNA kódujících různé fragmenty nesoucí transaktivační doménu. Tyto fragmenty jsou pak použity v konstrukci variant proteinu p53.

A4.1. PCR reakce

Amplifikační reakcí polymerasou byly získány různé fragmenty na různých matricích prostřednictvím různých oligonukleotidů. Tyto amplifikační reakce byly provedeny za následujících podmínek: Enzym Amplitaq-DNA-polymerasa (Perkin-Elmer) v pufru dodaném dodavatelem s koncentrací 0,2 mM dNTP, 100 ng matrice a 500 ng každého ze dvou oligopeptidů.

-cyklus: 2 minuty při 91°C

-cykly: 1 minuta při 91°C

1 minuta při 55°C

1 minuta při 72°C

-cyklus: 1 minuta při 72°C

A4.2. Konstrukce cDNA kódující oblast 411-490 virálního vektoru VP16 (VP16TA)

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 411-490 virálního proteinu VP16 (VP16 TA). Tato oblast nese transaktivační doménu tohoto proteinu.

Transaktivační fragment transaktivátoru odvozený od virálního proteinu VP16 (411-490) viru oparu byl získán řetězovou amplifikační reakcí (PCR) za použití podmínek již dříve definovaných (viz A4.1) a následujících oligonukleotidů 5'-VP16 a 3'-VP16:

5'VP16(SEQ ID n°17):

AAGCTTGAATTCGTTAACATGTCCACGGCCCCCGACC

3'-VP16 (SEQ ID n°18):

GGTCGACCACCGTACTCGTCAAT

a 100 ng plazmidu pUHD15-1 (Gossen a Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5547).

Fragment takto získaný obsahuje 334 párů bází, jejichž sekvence je daná SEQ ID n°2. Obsahuje ve své části N-konce methionin nesený iniciačním místem transkripce (ATG), přidáný tak do etapy klonování metodou PCR.

A4.2. Konstrukce cDNA kódující různé fragmenty schopné získávat aktivační doménu transkripce (transaktivační doména) proteinu p53 endogenu.

A4.2.1 Konstrukce cDNA kódující protilátku jednoduchého

řetězce schopnou vázat protein p53 (ScFv 42)

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující protilátku jednoduchého řetězce schopnou vázat protein p53 (ScFv 421). Tato konstrukce vyjádřena na intracelulární úrovni musí být schopna fixovat protein p53 divokého endogenu nebo mutant za účelem získání své transaktivační domény.

cDNA kódující ScFv 421 (příhláška vynálezu PCT/FR96/00477) může být extrakt ve formě fragmentu Nco I/Not I, který zahrnuje iniciační místo translace (ATG) a žádnou terminační sekvenci translace.

Takto získaný fragment obsahuje 766 párů bází, jejichž sekvence je daná SEQ ID n°36.

A4.2.2. Konstrukce cDNA kódující oblast 325-360 divokého proteinu p53 (325-360)

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 325-360 divokého proteinu p53 (325-360). Tato oblast nese doménu oligomerizace tohoto proteinu. Tato konstrukce na intracelulární úrovni, musí být schopna fixovat divoký protein p53 endogenní nebo mutant za účelem získání své transaktivační domény.

Odvozená oligomerizační doména divokého lidského proteinu p53 (325-360) byla získána řetězovou amplifikační reakcí (PCR) za použití podmínek dříve definovaných (viz A4.1) a následujících oligonukleotidů 5'-325 a 3'-360.

5'-325 (SEQ ID n°37):

AAGCTTGAATTCGTTAACGCCACCATGGGAGAATATTTACCCTT

3'-360 (SEQ ID n°38):

GGGTCGACCTGGCTCCTTCCCAGC

na 100 ng DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1).

Takto získaný fragment obsahuje 141 párů bází, jejichž sekvence je daná SEQ ID n°39. Obsahuje na N-konci methionin nesený iniciačním místem translace (ATG), přidaný v etapě klonování PCR a neobsahuje žádnou sekvenci terminace translace.

A4.2.3. Konstrukce cDNA kódující oblast 325-393 divokého proteinu p53 (325-393)

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA kódující aminokyseliny 325-393 divokého proteinu p53 (325-393). Tato oblast nese doménu oligomerizace tohoto proteinu. Tato konstrukce na intracelulární úrovni musí být schopna fixovat divoký protein p53 endogenní nebo mutant za účelem získání své transaktivační domény.

Tato odvozená oligomerizační doména divokého lidského proteinu p53 (325-360) byla získána řetězovou amplifikační reakcí (PCR) za použití podmínek dříve definovaných (viz A4.1) a následujících oligonukleotidů 5'-325 (SEQ ID n°37) a 3'-393.2:

3'-393 (SEQ ID n°40):

GGGTCGACCGTCTGAGTCAGGCCCTTC

na 100 ng DNA proteinu p53 (popsáno v příkladu A1)

Takto získaný fragment obsahuje 243 párů bází, jejichž sekvence je daná SEQ ID n°41. Obsahuje na N-konci methionin nesený iniciačním místem translace (ATG), přidaný tak v etapě klonování PCR a neobsahuje žádnou sekvenci terminace translace.

A5. Konstrukce cDNA kódující různé fragmenty nesoucí doménu oligomerizace

Tento příklad popisuje konstrukci různých cDNA kódujících různé fragmenty nesoucí doménu oligomerizace. Tyto fragmenty jsou pak použity v konstrukci variant proteinu p53. Tyto fragmenty byly získány amplifikační reakcí polymerasou na různých matricích (p53 pro homologní oblast a matrice různého původu pro heterologní oblast oligomerizace, zejména umělou) prostřednictvím různých oligonukleotidů. Amplifikační reakce byly provedeny za podmínek popsanych v příkladu A4.1.

A5.1. Konstrukce cDNA obsahující umělou oblast oligomerizace

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA obsahující umělou doménu oligomerizace, tvořenou umělým leucinovým zipem. Tato cDNA je pak použita pro konstrukci variant od fragmentů 75-325 (příklad A3.1) a 75-336 (příklad A3.2) lidského proteinu p53 a jejich modifikovaných derivátů na úrovni cysteinu 182.

Tato cDNA byla konstruována od 6 následujících nukleotidů.

Iz1-5' (SEQ ID n°19):

GATCTGAAGGCCCTCAAGGAGAAGCTGAAGGCC

Iz2-5' (SEQ ID n°20):

CTGGAGGAGAAGCTGAAGGCCCTGGAGGAGAAGCTG

Iz3-5' (SEQ ID n°21):

AAGGCACTAGTGGGGGAGCGATGATGAATCGATATCGC

Iz1-3' (SEQ ID n°22):

CTCCTCCAGGGCCTTCAGCTTCTCCTTGAGGGCCTTCA

Iz2-3' (SEQ ID n°23):

TAGTGCCTTCAGCTTCTCCTCCAGGGCCTTCAGCTT

Iz3-3' (SEQ ID n°24):

GGCCGCGATATCGATTCATCATCGCTCCCCAC

Tyto oligonukleotidy byly syntetizovány prostřednictvím automatického syntetizátoru DNA za použití chemie fosfoamidů. Těchto šest oligonukleotidů představuje komplementárnost v párech (Iz1-5'/Iz1-3', Iz2-5'/Iz2-3', Iz3-5'/Iz3-3') a komplementárnost řetězcovou (Iz1-3'/Iz2-5', Iz2-3'/Iz3-5') dovolující získat doménu oligomerizace jednoduchou hybridizací a ligací. Výsledná sekvence LZ je daná SEQ ID n°1.

A5.2. Konstrukce cDNA obsahující přirozenou doménu oligomerizace lidského proteinu p53

Tento příklad popisuje konstrukci cDNA obsahující přirozenou doménu oligomerizace lidského proteinu p53. Tato cDNA je reprezentována fragmentem kódujícím aminokyseliny 325 až 356 proteinu p53 získaného v konstrukci 75-367 (příklad A3.4), 75-AS (příklad A3.5), 75-393 (příklad A3.6) a jejich derivátů na úrovni modifikovaného cysteinu 182.

Příklad B. Konstrukce genů kódujících různé varianty proteinu p53

B1. Klonování různých fragmentů proteinu p53

Každý z různých fragmentů získaných PCR popsany v příkladu A byl klonován po PCR do vektoru pBC SK+ (Stratagen) za použití rozpoznávacích míst enzymy restrikce Hind III a Not I (Obrázek 3).

Produkty těchto konstrukcí nesou následující čísla:

75-325 ->pEC 104

75-336 ->pEC 106

75-343 ->pEC 171

75-367 ->pEC 131

75-AS ->pEC 132

75-393 ->pEC 133

Od těchto produktů mutagenezí řízenou za použití mutagenese in vitro řízenou oligonukleotidovým mutagením systémem (Amersham) a oligonukleotidu H182 byly získány odpovídající konstrukce nesoucí histidin v pozici 182. Tyto konstrukce nesou následující čísla:

75-325(H182) ->pEC 134

75-336(H182) ->pEC 135

75-367(H182) ->pEC 136

75-AS(H182) ->pEC 137

75-393(H182) ->pEC 138

B2. Fúze leucinového zipu s fragmentem 75-325, 75-336 a 75-343 a s jejich variantou H182

Oligonukleotidy obsahující leucinový zip (Iz1-5', Iz1-3', Iz2-5', Iz2-3', Iz3-5' a Iz3-3') byly fosforylovány pomocí T4 kinasy potom hybridovány všechny společně a vloženy do vektorů pEC 104, 106, 134 a 135 a 171, předběžně tráveny restričními enzymy BamHI a NotI (Obrázek 4).

Produkty těchto konstrukcí nesou následující čísla:

75-325-Iz ->pEC 107

75-336-Iz	->pEC 110
75-343-Iz	->pEC 174
75-325(H182)-Iz	->pEC 139
75-336(H182)-Iz	->pEC 140

B3. Fúze aktivační domény transkripce se souborem fragmentů p53

Konečné produkty byly získány ligací ke třem společníkům následujícím způsobem (Obrázek 5):

Aktivační doména transkripce odvozená od VP16, popsaná v příkladu A3 byla připravena enzymovou digescí restričními enzymy Hind III a Sal I produktů PCR .

Byly izolovány různé fragmenty proteinu p53 (75-325-Iz, 75-336-Iz, 75-343-Iz, 75-AS, 75-367, 75-393 a jejich varianty H182) po enzymové digesci restričními enzymy Sall a NotI plazmidů je obsahující.

Možné kombinace (aktivační doména/p53) byly vytvořeny a současně vloženy do vektoru pBC SK+ (Stratagen) a přednostně tráveny restričními enzymy Hind II a Not I.

Produkty konstrukce nesou následující čísla:

VP16-75-325-Iz	V-325	-->pEC 114 (SEQ ID n°25)
VP16-75-336-Iz	V-336	-->pEC 116 (SEQ ID n°26)
VP16-75-367	V-367	-->pEC 141 (SEQ ID n°27)
VP16-75-AS	V-AS	-->pEC 143 (SEQ ID n°28)
VP16-75-393	V-393	-->pEC 145 (SEQ ID n°29)
VP16-75-343-Iz	V-343	-->pEC 175 (SEQ ID n°30)
VP16-75-325(H182)-Iz	V-325H	-->pEC 147
VP16-75-336(H182)-Iz	V-336H	-->pEC 149

VP16-75-367(H182)	V-367H	-->pEC 151
VP16-75-AS(H182)	V-ASH	-->pEC 153
VP16-75-393(H182)	V-393H	-->pEC 155

Odpovídající produkty nesoucí oblast vázající specificky transaktivátor nebo transaktivační komplex k místu domény VP16 jsou konstruovány stejným způsobem. Tyto konstrukce jsou popsány následovně:

ScFv-75-325-Iz	S-325	-->pEC 176 (SEQ ID n°31)
ScFv-75-336-Iz	S-336	
ScFv-75-367	S-367	
ScFv-75-AS	S-AS	
ScFv-75-393	S-393	
ScFv-75-325(H182)-Iz	S-325H	
ScFv-75-336(H182)-Iz	S-336H	
ScFv-75-367(H182)	S-367H	
ScFv-75-AS(H182)	S-ASH	
ScFv-75-393(H182)	S-393H	
(325-393)-75-325-Iz	393-325	-->pEC 177 (SEQ ID n°32)
(325-393)-75-336-Iz	393-336	
(325-393)-75-367	393-367	
(325-393)-75-AS	393-AS	
(325-393)-75-393	393-393	
(325-393)-75-325(H182)-Iz	393-325H	
(325-393)-75-336(H182)-Iz	393-336H	
(325-393)-75-367(H182)	393-367H	
(325-393)-75-AS(H182)	393-ASH	
(325-393)-75-393(H182)	393-393H	
(325-360)-75-325-Iz	360-325	-->pEC 178 (SEQ ID n°33)

(325-360)-75-336-Iz	360-336
(325-360)-75-367	360-367
(325-360)-75-AS	360-AS
(325-360)-75-393	360-393
(325-360)-75-325(H182)-Iz	360-325H
(325-360)-75-336(H182)-Iz	360-336H
(325-360)-75-337(H182)	360-367H
(325-360)-75-AS(H182)	360-ASH
(325-360)-75-393(H182)	360-393H

Produkty obsahující doménu 325-360 proteinu p53 a transaktivační doménu (1-74) mohou být posouzeny smícháním syntetického separátoru (Hinge) získaného inzercí v místě Sal I s fragmentem DNA získaným hybridací syntetického oligonukleotidového páru komplementárního k Hinge-up a Hinge-down.

Hinge-up (SEQ ID n°42):

TCGAGGAGGTGGTGGCTCTGGAGGCGGAGGATCCGGCGGTGGAGGTTC

Hinge-down (SEQ ID n°43):

TCGAGAACCCCTACCGCCGGATCCTCCGCCTCCAGAGCCACCACCTCC

Sekvence výsledné dvouvláknové DNA Hinge je následující

TCGAGGAGGTGGTGGCTCGGAGGCGGAGGATCCGGCGGTGGAGGTTCCCTCCACC
ACCGAGACCTCCGCCTCCTAGGCCGCCATCCCCAAGAGCT

a odpovídající proteinová sekvence je (SEQ ID n°44):

Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly
-Gly-Ser

Odpovídající produkty jsou popsány následovně:

(325-360)-Hinge-75-325-Iz	360h-325 -->pEC 179 (SEQ ID n°34)
(325-360)-Hinge-75-336-Iz	360h-336
(325-360)-Hinge-75-367	360h-367
(325-360)-Hinge-75-AS	360h-AS
(325-360)-Hinge-75-393	360h-393
(325-360)-Hinge-75-325(H182)-Iz	360h-325H
(325-360)-Hinge-75-336(H182)-Iz	360h-336H
(325-360)-Hinge-75-367(H182)	360h-367H
(325-360)-Hinge-75-AS(H182)	360h-ASH
(325-360)-Hinge-75-393(H182)	360h-393H

Příklad C. Konstrukce expresních vektorů variant proteinu p53

Tento příklad popisuje konstrukci vektorů použitelných pro přenos nukleových kyselin podle vynálezu in vitro nebo in vivo.

C1. Konstrukce plazmidových vektorů

Pro konstrukci plazmidových vektorů byly použity dva typy vektorů.

-Vektor pSV2, popsán v DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Tento vektor je eukariontní vektor exprese. Nukleové kyseliny kódující varianty byly vloženy do vektoru ve formě fragmentů HpaI-EcoRV. Jsou tak umístěny pod řízením promotoru zesilovače transkripce viru SV40.

-Vektor pCDNA3 (Invitrogen). Jedná se zejména o eukariontní expresní vektor. Nukleové kyseliny kódující

varianty podle vynálezu jsou tak umístěny do vektoru pod řízením ranného promotoru CMV. Všechny konstrukce popsané v příkladu B3 byly vloženy do vektoru ve formě fragmentu Hind III/Not I za účelem testování v různých systémech in vivo.

C2. Konstrukce virových vektorů

Vynález spočívá v konstrukci a použití virových vektorů umožňujících přenos a expresi in vivo nukleových kyselin, které jsou dříve definované.

Pokud se jedná zejména o adenoviry, byly charakterizovány různé serotypy, jejichž struktura a vlastnosti se tak trochu mění. Mezi serotypy se s výhodou používají v rámci předloženého vynálezu lidské adenoviry typu 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenoviry zvířecího původu (viz přihláška vynálezu W094/26914). Mezi adenoviry zvířecího původu používaných v rámci předloženého vynálezu se mohou uvést adenoviry psího, hovězího a myšího původu (na příklad: Mavl, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovčího, prasečího, ptačího nebo opičího (na příklad: SAV). Adenoviry zvířecího původu jsou adenoviry psí, zejména adenovirus CAV2 [například souche manhattan nebo A26/61 (ATCC VR-800)]. V rámci předloženého vynálezu se s výhodou používají adenoviry původu lidského nebo psího nebo jejich směs.

Defektní adenoviry předloženého vynálezu obsahují ITR, sekvenci umožňující zejména enkapsidaci a nukleovou kyselinu podle vynálezu. V genomu adenoviru vynálezu alespoň oblast E1 je nefunkční. Pozorovaný virový gen může být zbaven funkce všemi odborníky známými technikami, zejména úplnou supresí, substitucí, částečnou delecí nebo adicí jedné nebo více básí v požadovaném genu nebo požadovaných genech. Tyto modifikace mohou být provedeny in vitro (na izolované DNA) nebo in situ, na příklad prostřednictvím technik genového oboru nebo také působením mutageních činidel. Mohou být modifikovány různé

oblasti, zejména oblast E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152), WO94/12649, WO95/02697) a L5 (WO95/02697). Podle upřednostňovaného způsobu provedení adenoviry podle vynálezu obsahují delecii v oblasti E1 a E4. Podle jiného upřednostňovaného způsobu realizace zahrnuje delecii v oblasti E1, kde je vložena oblast E4 a nukleová kyselina vynálezu (viz FR94 13355). Ve virech podle vynálezu delecie se přednostně rozprostírá v oblasti E1 nukleotidů 455 až 3329 v sekvenci adenoviru Ad5.

Defektní rekombinantní adenoviry podle vynálezu mohou být připraveny všemi odborníky známými technikami (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573, Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). Mohou být připraveny obecnou rekombinací mezi adenovirem a plazmidem nesoucím mezi jiným sekvenci DNA zájmu. Obecná rekombinace nastane po kotransfekci zmíněného adenoviru do linie přizpůsobených buněk. Linie použitých buněk musí zejména (i) být transformovatelná uvedenými elementy a (ii) obsahovat sekvence schopné doplnit část genomu defektního adenoviru, zejména v integrované formě za účelem vyhnutí se nebezpečí rekombinace. Například se může jednat o linii lidských ledvinových embrionárních buněk 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), která obsahuje zejména, začleněnou ve svém genomu, levou část genomu adenoviru Ad5 (12%) nebo se může jednat o linie schopné doplnit funkce E1 a E4 tak, jak je popsáno zejména v přihláškách vynálezů n°WO 94/26914 a WO95/02697.

Adenoviry, které jsou rozmnoženy jsou získány a purifikovány podle klasických technik molekulární biologie tak, jak je popsáno v příkladech.

Pokud jde o viry AAV, jedná se o viry DNA relativně malé velikosti, které se začleňují do genomu buněk, které infikují, stabilním způsobem a regiospecificky. Jsou schopné infikovat široké spektrum buněk, bez vyvolání vlivu na růst, morfologii nebo dělení buněk. Nezdá se, že by byly zahrnuty

do patologií u lidí. Genom AAV byl klonován, sekvenován a charakterizován. Obsahuje okolo 4700 basí a na každém konci obsahuje oblast obrácené repetice (ITR) se 145 básemi, které jsou replikačního původu pro virus. Zbytek genomu je rozdělen na dvě oblasti nesoucí funkce enkapsidace: levou část genomu, která obsahuje gen *rep* implikovaný do virální replikace a exprese virových genů a pravou část genomu, která obsahuje gen *cap* kódující kapsidové proteiny viru.

Použití vektorů odvozených od AAV pro přenos genů *in vitro* a *in vivo* bylo popsáno v literatuře (viz zejména WO 91/18088, WO 93/09239, US 4, 797, 368, US5, 139, 941, EP 488 528). Tyto přihlášky vynálezů popisují různé konstrukce odvozené od AAV, ve kterých geny *rep* nebo/a *cap* jsou deletovány a nahrazeny genem zájmu a popisují jejich použití pro přenos *in vitro* (na buňky v kultuře) nebo *in vivo* (přímo do organismu) výše uvedeného genu zájmu. Rekombinantní defektní AAV podle vynálezu mohou být připraveny kotransfekcí, v linii infikovaných buněk pomocným lidským virem (například adenovirem), plazmidu obsahujícího nukleovou sekvenci vynálezu lemovanou dvěma oblastmi obrácené repetice (ITR) AAV a plazmidu nesoucího gen enkapsidace (gen *rep* a *cap*) AAV. Použitelná linie buněk je na příklad linie 293. Rekombinantní produkty AAV jsou pak purifikovány klasickými technikami.

Pokud jde o viry oparu a retroviry, konstrukce rekombinantních vektorů byly široce popsány v literatuře: viz zejména Breakfield et al., *New Biologist* 3 (1991) 203, EP 453242, EP178220? Bernstein et al. *Genet. Eng.* 7 (1985) 235, McCormick, *BioTechnology* 3 (1985) 689, atd. Retroviry jsou integrativní viry, selektivně infikující buňky ve fázi dělení. Tvoří tak vektory zájmu pro rakovinové aplikace. Genom retrovirů obsahuje zejména dvě LTR, jednu sekvenci enkapsidace a tři kódovací oblasti (*gag*, *pol* a *env*). V rekombinantních vektorech odvozených od retrovirů, geny *gag*,

pol a env jsou všeobecně deletovány zčásti nebo úplně a nahrazeny sekvencí heterologní nukleové kyseliny zájmu. Tyto vektory mohou být realizovány od různých typů retrovirů, zejména MoMuLV (murine moloney leukemia virus, také označen MoMLV), MSV (murine moloney sarcoma virus), HaSV (harvey sarcoma virus), SNV (spleen necrosis virus), RSV (rous sarcoma virus) nebo také od Friendova viru.

Pro konstrukci rekombinantních retrovirů podle předloženého vynálezu obsahující nukleovou kyselinu podle předloženého vynálezu, plazmid obsahující zejména LTR, sekvenci enkapsidace a výše uvedenou nukleovou kyselinu je konstruován, pak použit pro transfekci linie buněk řečené enkapsidace, schopné přinést ve transretrovirálních funkcích se sníženou schopností do plazmidu. Všeobecně jsou linie enkapsidací tak schopné exprimovat geny gag, pol a env. Tyto linie enkapsidace byly popsány v dřívějších oborech, zejména linie PA317 (US4,861,719), linie PsiCRIP (WO90/02806) a linie GP+envAm-12 (WO89/07150). Jinak rekombinantní retroviry mohou připustit modifikace na úrovni LTR pro potlačení transkripční aktivity, stejně jako sekvence enkapsidace, obsahující část genu gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Rekombinantní retroviry jsou pak purifikovány klasickými technikami.

Pro provedení předloženého vynálezu je především výhodné použití rekombinantního defektního adenoviru nebo retroviru. Tyto vektory mají vsutku vlastnosti zajímavé zejména pro přenos genů do nádorových buněk.

C3. Chemické vektory

Mezi syntetickými vyvinutými vektory se s výhodou používají v rámci předloženého vynálezu kationické polymery polylyzinového typu, (LKLK)_n, (LKKL)_n, polyethylenimin a DEAE dextran nebo také lipidy kationické nebo lipofektanty. Mají

schopnost kondenzovat DNA a podporovat její spojení s buněčnou membránou. Mezi těmito posledně jmenovanými se mohou uvést lipopolyaminy (lipofektamin, transfektam atd.) různé kationické lipidy nebo neutrální lipidy (DOTMA, DOGS, DOPE atd.), tak jako peptidy nukleárního původu. Byl vyvinut koncept cílové transfekce prostřednictvím receptoru, který využívá principu kondenzování DNA díky kationickému polymeru řídícímu fixaci komplexu k membráně díky chemické vazbě mezi kationickým polymerem a ligandem membránového receptoru, který je přítomný na povrchu buněčného typu, který má být roubován. Cílový receptor transferinu, inzulínu nebo receptor asialoglykoproteinů hepatocytů byl také popsán. Příprava kompozice podle vynálezu používající takovýto chemický vektor je realizována podle všech odborníky známých technik, všeobecně jednoduchým uvedením do kontaktu různých sloučenin.

Příklad D. Posouzení funkcí variant proteinu p53

Varianty proteinu p53 podle předloženého vynálezu byly oceněny v buněčném testu pro následující kritéria:

- vazba k sekvenci specifické dvouvláknové DNA
- transaktivační funkce
- antiproliferativní aktivita
- apoptická aktivita
- onkogení potenciální spojení s určitými mutacemi proteinu p53

Pro toto posouzení jsou použité konstrukce V-325, V-336, V-343 a AS, které jsou popsány v příkladu B.

D1. Rozpoznání sekvence specifické dvouvláknové DNA

hybridními molekulami podle předloženého vynálezu

D1.1 Tvorba hybridních molekul

cDNA divokého proteinu p53 byla klonována do vektoru pBlueBacIII (Invitrogen) v místě BamHI. Inzercí do plazmidu pAcHLT-A (Pharmingen) fragmentu obsahujícího cDNA V325 získaného digescí plazmidu pEC114 enzymy EcoR I a Nit I byl vytvořen vektor umožňující získat rekombinantní bakulovirus mající za cíl expresi proteinu V325 označeného na N-konci peptidovou sekvencí, obsahující mezi jiným spojení šesti zbytků histidinu. Od těchto vektorů rekombinantních byly vytvořeny bakuloviry a purifikovány podle výrobcem uvedených návodů (Invitrogen, Pharmingen). Tyto dva proteiny byly homogeně purifikovány od nukleárních extraktů hmyzích infikovaných buněk SF9 jejich bakuloviry, nukleární extrakty byly získány postupem popsaným Delphinem et al. (C. Delphin, Eur. J. Biochem., 223, 683-692, 1994).

Divoký protein p53 byl purifikován imunoafinitou na monoklonálních protilátkách pAb421 (Oncogene Sciences, Ab-1) podle následujícího protokolu: infikovaný nukleární extrakt buňky se inkubuje po dobu třech hodin při teplotě 4°C s proteinovým gelem A-agarosy, na kterém byla kovaltně vázána protilátka pAb421. Po extenzivním vymytí gelu puforem 50 mM TrisHCl o pH 7,8 obsahující 1 M KCl a inhibitory proteas, protein p53 se eluuje peptidem odpovídajícím epitopu, rozpoznaného touto protilátkou na protein p53 (KKGQSTSRHK), tento peptid byl použit v koncentraci 5 mg / ml v roztoku použitém pro vymývání. Po koncentraci na Centrikon-30 (Amicon Grace), eluovaný protein p53 se separuje a purifikuje k homogenitě permeací na gelu na koloně Superosa 6 HR10/30 ekvilibrované 50 mM TrisHCl pH 7,5, 0,2 M NaCl, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM ZnCl₂, 10 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 0,1 % NP-40, 5% glycerolu. Frakce obsahující protein p53 jsou alikvotní a jsou bezprostředně zmrazeny na -80°C až do použití.

Protein V325 označený na N-konci peptidovou sekvencí obsahující mezi jiným spojení šesti zbytků histidinu nazvaný od nynějška HisV325 byl purifikován postupem, který byl upraven Hochuliem et al. (Bio/Technology Vol 6 (1988) 1321). Dříve než byl aplikován na gel (Niskel-NTA agarosa) nukleární extrakt infikovaných buněk, byl zbaven solí na koloně PD10 (Pharmacia) ekvilibrované 50 mM fosfátovým pufrům pH 8, který obsahoval 5 mM β -merkapt ethanolu, 0,1 % NP-40 a směs inhibitorů proteas. Inkubace nukleárního extraktu s gelem (Nickel-NTA agarosa) byla provedena v tomto pufru po dobu jedné hodiny při teplotě 4°C za současného míchání. Gel byl potom vmyt stejným pufrům o pH 6. Protein HisV325 je eluován 0,3 M imidazolem v posledně jmenovaném pufru po promytí gelu 0,1 M imidazolem. Frakce obsahující HisV325 jsou alikvotní a jsou okamžitě zmrazeny na -80°C až do jejich použití.

D1.2. Konstrukce sekvence specifické dvouvláknové DNA

Sekvence specifické dvouvláknové DNA použité v tomto pokusu je složena ze dvou syntetizovaných oligonukleotidů, jejichž sekvence je následující:

Oligo 5568 (SEQ ID n°45):

GATCCGAACATGTCCCAACATGTTGA

Oligo 5569 (SEQ ID n°46):

AGCTTCAACATGTTGGGACATGGTCG

Tyto dva syntetické oligonukleotidy byly značeny fosforem 33 třicetiminutovou inkubací při teplotě 37°C 5 pmolů každého oligonukleotidu ve 20 μ l následujícího reakčního prostředí:

Tris-HCl pH 7,6 50 mM

MgCl ₂	10 mM
dithiotreitol	5 mM
Spermidin	100 μM
EDTA	100 μM
ATP-γ- ³³ P (Amersham)	50 μ Ci (1000-3000 Ci/mmol)
T4 kinasa (Boehringer)	10 U

Tyto dva oligonukleotidy takto značené byly hybridovány v přítomnosti 100 mM NaCl pro obnovení dvouvláknové sekvence WAF-RE obsahující specifickou sekvenci rozpoznanou proteinem p53 v oblasti promotoru genu WAF-1 (W.S. EI-Deiry, Cell Vol 75 (1993) 817):

GATCCGAACATGTCCCAACATGTTGA

GCTTGTACAGGGTTGTACAACTTCGA

D1.3 Rozpoznání dvouvláknové sekvence WAF-RE hybridními molekulami podle vynálezu

Pro prokázání specifického rozpoznání dvouvláknové sekvence WAF-RE hybridními molekulami podle vynálezu byly provedeny opožděné pokusy na gelu na základě principu popsaného dále. Reakce vazby DNA je provedena v 25 μl reakčním prostředí (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,05 mM ZnCl₂, 5mM dithiotreitol, 0,1 mg/ml BSA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 0,1M NaCl, 2 μg/ml aprotinin, 2 μg/ml E-64, 2 μg/ml leupeptin, 2 μg/ml pepstatin) přidáním sekvence WAF-RE (2,4 10⁻⁹M) připravené podle předcházejícího pokusu, 1,2 10⁻⁶M soutěžního chladného oligonukleotidu AP2 (Promega) použitého pro nespecifickou fixaci a 30 ng hybridních molekul pro testování přítomnosti nebo nepřítomnosti divokého proteinu p53 (mezi 3 a 30 ng), divoký protein p53 může být aktivován pro svou aktivitu specifické fixace k DNA prostřednictvím 300

ng protilátky pAb421 (T.R. Hupp, Cell Vol 71 (1992) 875). Reakční směs se inkubuje po dobu 30 minut na ledu a konečná směs se podrobí nativní elektroforéze na 4% polyakrylamidovém gelu s pohybem při 200V a při teplotě 16°C. Gel se pak suší a autoradiografuje.

Výsledek ukázkového pokusu soutěže mezi divokým proteinem p53 a HisV325 ve zpoždění na gelu je ukázán na Obrázku 6. Tento výsledek ukazuje, že His-V325 rozpozná dvouvláknovou sekvenci WAF-RE afinitou srovnatelnou s afinitou divokého proteinu p53. Může se poznamenat, že HisV325 dává na opožděném gelu majoritní pruh, který se pohybuje rychleji než pruh získaný s divokým proteinem p53. Toto by mohlo naznačovat, že HisV325 se fixuje ve formě dimerů. Je tedy možné předpokládat, že tento pruh není ani posunut ani amplifikován přítomností pAb421. V nepřítomnosti pAb421 divoký p53 se fixuje mnohem méně RE-Waf než V325.

D2. Posouzení transaktivační funkce

Transaktivační funkce konstrukcí byla posouzena v systému transaktivace in vivo v buňkách SAOS-2 (lidský osteosarkom), nedostatečně vyvinutých pro dvě alely proteinu p53 (buňky přístupné ATCC pod číslem HTB85) a v nádorové linii H358 (Maxwell a Roth, Oncogene 8 (1993), 3421) a HeLa (ATCC CCL 2). Tento systém spočívá v použití donašečského genu dávkovatelného enzymaticky a umístěného v závislosti na promotoru obsahující nukleotidový motiv specifického rozpoznání divokou formou proteinu p53 (viz experimentální protokoly).

V těchto testech, nosný gen je gen CAT (chloramfenikolacetyl-transferasa) a sekvence rozpoznání proteinem p53 je shodná sekvence (p53RE) definovaná Funkem a spolupracovníky (Mol. Cell. Biol. 12 (1992) 2866).

Posouzení této funkce bylo provedeno ve srovnání s funkcemi divokého proteinu pro tři typy různých kritérií.

D2.1. Transaktivační aktivita v odpovídajících dávkách

Buňky ($3,5 \cdot 10^5$) byly naočkovány na Petriho misku o průměru 6 cm, která obsahovala 3 ml kultivační půdy DMEM (Gibco BRL) s přidavkem 10% telecího plodového séra inaktivovaného teplem a kultivovány přes noc pod 5% CO_2 při teplotě 37°C . Takto byly transfektované různé konstrukce za použití lipofectAMINu (Gibco BRL) jako agentu transfekce následujícím způsobem: 3 μg plazmidu bylo inkubováno (mezi nimi 0,5 μg plazmidového reportéru) s 10 μl lipofectAMINu po dobu 30 minut se 3 ml kultivační půdy Opti-MEM (Gibco BRL) bez séra (transfekční směs). Během tohoto času se buňky dvakrát propláchly PBS a potom byly inkubovány 4 hodiny při teplotě 37°C s transfekční směsí, která byla pak odsáta a nahrazena 3 ml kultivační půdy DMEM (Gibco BRL) s přidavkem 10% telecího plodového séra inaktivovaného teplem a buňky byly ponechány ještě 48 hodin při teplotě 37°C .

Protokol dávkování aktivity CAT

48 hodin po transfekci buňky byly jednou promyty PBS potom seškrábnuty a znovu zařazeny do 100 μl 0,25 M pufru Tris pH 8 a lyzovány třemi cykly zmražování - rozmražování probíhá v lázni ethanol / led. Buněčný extrakt takto získaný byl odstředěn při 10000 rpm po dobu 15 minut a získaný supernatant byl použit pro dávkování aktivity. Tato je provedena přidavkem 20 μl buněčného extraktu ke 130 μl reakční směsi, jejíž konečné složení je následující:

- Acetylkoenzym A 0,4 mM
- Chloramfenikol, D-threo-(dichloracetyl-1,2- ^{14}C 23mM (200nCi)
- Tris 0,18 M pH 8

Po jedné hodině inkubace při teplotě 37°C reakční

produkty byly extrahovány 250 μ l ethylacetátu, z tohoto extraktu 20 μ l bylo umístěno na křemenné desce (chromatografie na tenké vrstvě) s eluční směsí obsahující 95% chloroformu a 5% methanolu. Chromatografická destička takto získaná je nakonec vyvolána pomocí detekčního přístroje (Packard instruments), který umožňuje vypočítat poměr různých produktů acetylace, poměr ukazuje aktivity enzymu Chloramfenikol-acetyl-transferasa a tedy transaktivační aktivitu různých konstrukcí.

Získané výsledky v linii SAOS-2 s konstrukcemi umístěnými pod řízením promotoru CMV (pCDNA3) jsou uvedeny na Obrázku 7 a 8 a ukazují následující vlastnosti pro každou konstrukci:

- protein p53 představuje dávku aktivity závislou, která směřuje k nasycení pro zvýšené dávky (od 100 ng plazmidu). Tato saturace může vyjádřit nezbytnost kofaktorů, které by byly limitující za těchto podmínek.

- protein AS zachovává schopnost transaktivační aktivity divokého proteinu

- proteiny V-325, V-336 a V-343 prokazují, stejně jako protein p53, transaktivační aktivitu, nezdaří se, že jsou schopné nasycení v silných dávkách. Je tedy možné, že tato zjevná nepřítomnost saturace potom vede k celkovému zvýšení aktivity. Je možné také pozorovat mimo jiné, že konstrukce V-325 je aktivnější než její homology V-336 a V-343, tato konstrukce navrhuje, aby chimérické proteiny obsahovaly oblast 75-325, a byly tak zejména výhodné.

S cílem potvrdit tyto vlastnosti byly provedeny podobné pokusy v nádorové linii H 358, která je stejně jako linie SAOS-2 vadná na obou alelách genu p53. V těchto pokusech, každá transfekce byla provedena s 50 ng každé konstrukce umístěné v závislosti promotoru CMV. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1, která jasně ukazuje, že dvě varianty V-325 a V-336

prokazují zlepšenou transaktivační aktivitu vzhledem k transaktivační aktivitě divokého proteinu p53 s tím, že opět opět lepší aktivitu vykazuje variant V-325.

Tabulka 1: Transaktivační aktivita v buňkách nádorové linie H358.

	pCDNA 3	divoký p53	V-325	V-336
relativní aktivita CAT	1	6	25	16

Tyto dva pokusy potvrzují, že varianty podle vynálezu mají alespoň jednu vlastnost vylepšeného proteinu p53.

Za účelem ověření, že tento rozdíl aktivit není způsoben rozdílem exprese, ale přírůstkem aktivity variant podle vynálezu, úroveň exprese divokého proteinu p53 a variant V-325, V-336 a V-343 byla analyzována v buňkách SAOS-2. Za tímto účelem buňky byly transfektovány 3 μ g každého plazmidu použitého v předchozím pokusu a znovu získány 24 hodin a 48 hodin po transfekci. Po dvou promytí v pufru PBS (Gibco BRL), buňky byly lyzovány po dobu 15 minut při teplotě 4°C v 50 μ l pufru RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 1% deoxycholátu sodného, 0,1% dodekylsulfátu sodného) s přidavkem 2 mM PMSF, 20 μ g/ml aprotinu, 2 μ g/ml E64, 2 μ g/ml leupeptinu a 2 μ g/ml pepstatinu. Po 15 minutách odstředování při 15000 rpm, supernatanty byly odebrány, přidány k elučnímu pufru (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) a podrobeny elektroforóze na 10% polyakrilovém gelu v denaturujícím prostředí 200V podle již popsaného protokolu (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Proteiny byly potom přeneseny na membránu PVDF (NEN Resaerch Products) za použití přenosného systému semi-sec NOVEX za dodržení doporučení výrobce a detekovány pomocí monoklonálních protilátek pAb 240 (Oncogene Sciences, Ab-3) a sekundárních protilátek (králík, anti-myš) spřažených s peroxidasou (Nordic Immunology) za použití soupravy ECL

(Amersham).

Výsledky tohoto pokusu ukázány na Obrázku 9 dokazují, že varianty V-325 a V-336 jsou exprimovány na srovnatelné úrovni s variantami divokého proteinu p53, a že varianta V-343 se zdá poněkud lépe exprimována než předchozí varianty. Z většího srovnání úrovně exprese ve 24. a 48. hodině lze indikovat, že relativní stabilita každé konstrukce je podobná. Tento výsledek ukazuje, že aktivita variant podle vynálezu V-325 a V-336 není způsobena lepší expresí, ale pravděpodobně potenciálem aktivátoru přírůstku transkripce, což je v rozporu s variantou V-343.

Později s cílem potvrdit schopnost variant podle vynálezu aktivovat umístěný gen v závislosti na elementu rozpoznání divokého proteinu p53 byla provedena studie aktivity endogenních genů s ohledem na expresi genů hdm2 a WAF1 běžně indukovaných proteinem p53.

Tento pokus byl proveden v linii buněk EB (rakovina tračnicku) vadných na obou alelách kódujících protein p53 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495). Stabilní klon exprimující protein p53 pod řízením promotoru indukovatelného methationinem z této linie byl konstruován (klon EB-1 (Shaw et al., PNAS 89 (1992) 4495)). Stejným způsobem byl konstruován další stabilní klon exprimující protein V-325 pod řízením promotoru indukovatelného methallotioneinem za použití plazmidu odvozeného od vektoru pmIMT1i (získaný podle P. Shawa) inzercí cDNA kódující protein V-325 z míst EcoR I - Not I (pmIMT1i-V325). Za tím účelem byly transfektovány buňky EB ($3,5 \cdot 10^5$ buněk) $1,3 \mu\text{g}$ plazmidu pmIMT1i-V325 a 200 ng plazmidu pcDNA3 podle protokolu již dříve popsaneho, stabilní klony byly šlechtěny po transfekci růstem v kultivačním mediu obsahujícím $800 \mu\text{g/ml}$ geneticinu. Byl vybrán klon exprimující V-325 indukovatelný na srovnatelné úrovni exprese proteinu p53 v klonu EB-1 (klon EB-V325).

Klony EB-1 a EB-V325 stejně jako rodičovské buňky EB (10^6 buněk) byly podrobeny působení $ZnCl_2$ ($200\mu M$) a buněčný extrakt byl podroben v různých časech elektroforéze a přenesen na membránu, jak je dříve popsáno. Přenesené buňky byly detekovány třemi různými protilátkami, monoklonální protilátkou pAb240 řízenou proti proteinu p53 a dvěma protilátkami polyklonálními, jednou řízenou proti proteinu hdm2 a druhou proti proteinu WAF1. Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na Obrázku 9, který ukazuje, že: 1) protein p53, chybí v buňkách EB, EB-V325 a EB-1, v nepřítomnosti indukce je exprimován v klonu EB-1 4 hodiny po začátku působení zinku a varianta V-325 je exprimovaná stejným způsobem v klonu EB-V325, 2) protein WAF1, jehož exprese se zdá, že indukuje v buňkách EB působením zinku čtyři hodiny po začátku svou expresi prodlouženou až na 16 hodin v klonech EB-1 a EB-V325 a 3) indukce proteinu hdm2 nebyla pozorovatelná, než v klonech EB-1 a EB-V325 se zvýšenou expresí v klonu EB-V325.

Tyto výsledky ukazují, že aktivita transkripce variantou V-325 se vyjadřuje indukcí exprese genů normálně indukovaných divokým proteinem p53 a že tato varianta představuje přírůstek aktivity ve fyziologickém kontextu vzhledem k divokému proteinu p53.

D2.2-Vliv proteinu E6 (HPV18) na transaktivační funkci

Použité protokoly jsou shodné s těmi, které jsou popsány v příkladu D1.1. V tomto pokusu konstrukce umístěné pod řízením promotoru CMV (pCDNA3) byly kotransfektovány s růstovou koncentrací plazmidu exprimujícího E6 pod řízením promotoru SV40 (pSV2). Získané výsledky v linii SAOS-2 jsou uvedeny na Obrázku 11 a ukazují následující vlastnosti pro každou konstrukci:

- aktivita proteinu p53 se snižuje se zvyšováním koncentrace E6, tento úbytek aktivity p53 je velmi

pravděpodobně obrazem degradace proteinu p53, který je vyvolán E6.

- protein V-336 ukazuje absenci citlivosti na E6

- protein V-325 se zdá, že může být lehce aktivován E6. Protein V-325 je vždy a za všech situacích více aktivní než protein p53. Za účelem potvrzení rozdílu tohoto chování oproti proteinu E6, byla testována transkripční aktivita konstrukcí V-325 a V-336 v pozitivních buňkách HPV18 (HeLa) exprimující protein E6 a porovnávána s transkripční aktivitou divokého proteinu p53.

V tomto příkladu transfekce provedené podle protokolu již dříve popsaného byly umístěny různé konstrukce pod řízením promotoru CMV (pCDNA3).

Výsledky uvedené na Obrázku 12 ukazují velmi čistou transkripční aktivitu dvou konstrukcí V-325 a V-336 a velmi nízkou aktivitu divokého proteinu p53, to vychází z předpokladu, že tyto dvě konstrukce nejsou citlivé na E6 na rozdíl od divokého proteinu.

Pro testování, je-li tato nepřítomnost citlivosti k proteinu E6 odrazem lepší stability k degradaci indukované těmito proteiny, byly provedeny pokusy degradace in vitro.

Byly získány různé molekuly použité v tomto pokusu translací in vitro při lýze retikulocytů, molekul popsaných v příkladu C1 (vektor pCDNA3) za použití soupravy TNT Coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega) podle experimentálního protokolu, který popisuje dodavatel pro reakční objem 50 μ l.

Pro tento pokus hybridní molekuly podle vynálezu V-325 a V-336 stejně jako divoký protein p53 jsou produkty translace in vitro v přítomnosti 44 μ Ci 35 S-methioninu (Amersham) (1175 Ci/mmol), aby se vytvořily tyto hybridní molekuly radioaktivně značené. Protein E6 (HPV18) je produkt vytvořený za stejných podmínek, ale v nepřítomnosti

³⁵S-methioninu.

2 μ l každého produktu radioaktivně značeného (p53, V-325 a V-336) byly inkubovány při teplotě 30°C s 2 μ l proteinu E6 radioaktivně neznačeným a s 10 μ l lysovaného retikulocyty v konečném objemu 40 μ l pufru 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 3 mM DTT. Reakce byla zastavena v různých časových úsecích a vždy bylo odebráno z reakční směsi 7,5 μ l a tento objem byl opět nahrazen přídatkem 7,5 μ l elučního pufru (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970), takto připravené vzorky byly podrobeny elektroforéze na 10% polyakrilovém gelu v denaturujícím prostředí při 200V podle předem popsaného protokolu (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Gel byl potom sušen a detekován pomocí zařízení pro detekci (Packard instruments), které umožňuje určit množství variant podle vynálezu, které nebyly degradovány v průběhu reakce.

Výsledky tohoto pokusu jsou uvedeny na Obrázku 14, který jasně ukazuje, že varianty V-325 a V-336 jsou rezistentnější než divoký protein p53 k denaturaci indukované E6, varianta V-325 vykazuje opět lepší vlastnosti v termínu rezistence k degradaci. Tyto výsledky odrážejí rozdíly citlivosti divokého proteinu p53 a variant V-325 a V-336 k proteinu E6 pozorované na úrovni transkripční aktivity v předchozích pokusech (Obrázek 11 a 12).

Toto chování činí tyto dvě konstrukce výhodné zejména při léčení patologií spojených s infekcemi způsobenými HPV16 nebo HPV18.

D2.3. Vliv dominantního negativního mutantu proteinu p53 na transkripční funkci

V tomto příkladu byl použit mutant H175 popsaný jako dominantní onkogení a dominantní negativní oproti divokému

proteinu p53. V tomto příkladu transfekce provedeného podle protokolu již dříve popsaného byly umístěny různé konstrukce stejně jako mutant H175 pod řízením promotoru CMV (pcDNA3). Každá konstrukce byla kotransfektovaná s růstovou koncentrací plazmidu exprimujícího mutant H175.

Výsledky uvedené na Obrázku 14 ukazují následující vlastnosti pro každou konstrukci:

- protein p53 snižuje svou transaktivační aktivitu v přítomnosti nadbytku mutované formy H175, to odpovídá fyziologické situaci, je známo, že tento typ v mutované formě je stabilnější než divoký protein p53, a je tedy vždy v nadbytku. Měří se tedy dominantní negativní vliv tohoto mutantu.

- protein AS vykazuje přírůstek citlivosti k dominantnímu negativnímu vlivu mutantu H175, protože je citlivý ke slabším koncentracím tohoto mutantu.

- naopak proteiny V-325 a V-336 nejsou jenom citlivější k vlivu dominantnímu negativnímu, ale jejich zvýšená aktivita je závislá na velikosti dávky přítomné mutované formy H175. Opět v tomto pokusu protein V-325 vykazuje zvýšený tento vliv vzhledem k proteinu V-336 potvzující to trochu více ve svém možném statutu superdivokém.

D2.4. Vliv proteinu hdm2 na transaktivační funkci

Použité protokoly jsou identické k již dříve popsaným v příkladu D1.1. V tomto příkladu transfekce byly konstrukce umístěny pod řízením promotoru CMV (pcDNA3), byly kotransfektovány s růstovou koncentrací plazmidu exprimujícího hdm2 (fragment 1-134) pod řízením promotoru CMV (pcDNA3). Výsledky získané v linii SAOS-2, uvedené na Obrázku 15, ukazují následující vlastnosti pro každou konstrukci:

- aktivita proteinu p53 se snižuje se zvyšováním koncentrace hdm2, což odpovídá fyziologické situaci

- protein V-325 se zdá být necitlivý k této inhibici hdm2.

Toto chování činí protein V-325 superdivokým kandidátem výhodným zejména pro léčení patologií spojených se superexpresí hdm2 a také při léčení patologií spojených se silnou expresí buněčných proteinů interagujících s N-koncem proteinu p53.

Výsledky těchto čtyř pokusů jasně ukazují, že varianty podle vynálezu, zejména varianty obsahující oblast 75-325-Iz nebo 75-336-Iz, představují 1) zvýšenou transkripční aktivitu, 2) menší citlivost k vlivu proteinu E6 HPV18, 3) nepřítomnost citlivosti k dominantnímu negativnímu vlivu jistých mutantů proteinu p53 a vzrůst aktivity v takovém kontextu a 4) nepřítomnost citlivosti k proteinu hdm2. Tyto různé vlastnosti jsou docela pozoruhodné a nečekané a udělují variantám podle vynálezu terapeutické význačné přednosti.

D3. Vliv na buněčný růst

Vliv konstrukcí V-325 a V-336 na buněčný růst byl testován současně s proteinem p53 na různých typech buněčných linií v pokusu o tvorbu rezistentních kolonií k neomycinu následující transfekcí plazmidů exprimující tyto tři proteiny.

V tomto pokusu transfekce provedené podle protokolu již dříve popsaného byly umístěny různé konstrukce pod řízením promotoru CMV (pCDNA3).

Protokol tvorby kolonií rezistentních k neomycinu

48 hodin po transfekci buňky byly odebrány a umístěny na Petriho misky o průměru 10 cm a podrobeny růstu s 10 ml

kultivačního média DMEM s přidavkem 10% plodového hovězího séra inaktivovaného teplem, které obsahuje 400 µg/ml geneticinu (G418). Po 15 dnech kultivace v přítomnosti G418 byl počet kolonií Neo^R určen počítáním po barvení fuchsinem.

Tyto pokusy byly provedeny na různých typech buněk, jejichž statut proteinů p53 a Ras je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Statut buněčných linií použitých v testu tvorby kolonií Neo^R

linie	p53	Ras	superexpres e hdm2	n°ATCC
SAOS-2	- /-	?	-	HTB 85
HCT116	?	mutovaný Ki-Ras	-	CCL 247
H322	L 248	?	-	(*)
H460	divoký	mutovaný Ki-Ras	-	HTB 177
HeLa	divoký	?	-	CCL 2
OsA-CL	?	?	+	(**)

(*) Putnam et al., Surg. Oncol., 1 (1993), 49

(**) Oliner et al., Nature, 358, (1992), 80

Výsledky pokusů jsou uvedeny v Tabulce 3 a na Obrázku 16.

Tabulka 3: Tvorba kolonií Néo^R

linie	vektor	divoký p53	V-325	V-336
SAOS-2	253	17	12	13
HCT116	112	62	58	61
H322	93	5	2	3
H460	153	110	87	92
HeLa	172	151	31	47

Tyto výsledky ukazují, že konstrukce V-325 a V-336 mají schopnost blokovat buněčný růst způsobem alespoň tak účinným jako divoký protein p53 v buněčných kontextech, kde tento protein může normálně fungovat (divoký p53 nebo dvojnásobně deletovaný), ale především, že tyto konstrukce zachovávají tyto aktivity dokonce i v buňkách, kde je divoký protein p53 velmi málo aktivní (buňky HeLa exprimující protein E6 HpV18 a buňky OsA-CL prezentující zvýšenou expresi proteinu hdm2). Tyto vlastnosti udělují variantám podle vynálezu významné terapeutické výhody.

D4. Apoptická aktivita variant podle vynálezu

Apoptická aktivita podle vynálezu byla studována za použití buněk EB, EB-1 a EB-V325 a podmínek indukce již dříve popsaných (příklad D1).

Buňky takto indukované (10^6 buněk) byly fixovány a permeabilizovány inkubací po dobu 40 minut v 1 ml Permeafixu (Ortho Diagnostic Systems Inc.), potom dvakrát promyty pufrům A (PBS (Gidco BRL) s přidavkem 0,5% Tweenu 20), pak byly resuspendovány a inkubovány po dobu jedné hodiny a při okolní teplotě ve 100 μ l pufru A s přidavkem 2% BSA (PBS-BSA) a 1 μ g monoklonální protilátky pAb240. Po dvou nových promytí pufrům PBS-BSA, buňky byly inkubovány po dobu jedné hodiny a při okolní teplotě v 100 μ l stejného pufru s přidavkem 1 μ g

polyklonální protilátky sekundárně vázané k fluoresceinu (GAM-FITC (Immunotech)). Potom byly buňky dvakrát promyty pufrům A, resuspendovány v 1 ml stejného pufru obsahujícího, 5 mg propidium jodidu a 1 mg RNasy (DNasa-free) a inkubovány po dobu 30 minut při okolní teplotě, potom byly analyzovány cytometricky.

Výsledky pokusu 24 a 48 hodinové indukce provedené na buňkách EB-1 a EB-V325 jsou uvedeny na Obrázku 17. Za těchto podmínek buňky exprimující divoký protein p53 nebo jeho variantu V-325 (detekovaný protilátkami pAb240) jsou majoritně rozděleny na fázi G1 a sub-G1 (apoptóza) po 24 hodinách indukce a po 48 hodinách hlavně na sub-G1. Tento výsledek jasně ukazuje, že protein V-325 je schopný, stejně jako divoký protein p53, indukovat apoptózu.

Výsledky kinetického pokusu indukce provedeného na buňkách EB a klonech EB-1 a EB-V325 uvedené na Obrázku 18 ukazují, že varianta V-325 indukuje rychleji a mohutněji apoptózu než divoký protein p53. S ohledem na fakt, že tyto dva proteiny se zdají být exprimovány na srovnatelných úrovních v klonech (viz D1) výsledek připouští myšlenku zlepšení aktivity varianty V-325 vzhledem k aktivitě divokého proteinu p53.

Seznam sekvencí

(1) Všeobecné informace:

(i) podavatel:

- (A) Jméno: RHONE-POULENC RORER S.A.
- (B) Ulice: 20, Raymond ARON
- (C) Město: ANTONY
- (D) Země: Francie
- (E) Směrovací číslo: 92165
- (G) Telefon: (1) 40.91.69.22
- (H) Fax: (1) 40.91.72.91

(ii) název vynálezu: Varianty proteinu p53 a jejich terapeutické použití

(iii) počet sekvencí: 46

(iv) způsob luštění počítačem:

- (A) Typ nosiče: Floppy disk
- (B) počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) systém využití: PC-DOS/MS-DOS
- (D) logika: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 1:

(i) charakteristika sekvence:

- (A) délka: 112 párů bází
- (B) typ: nukleotid
- (C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 1:

AGATCTGAAG GCCTCAAGG AGAAGCTGAA GGCCCTGGAG GAGAAGCTGA	50
AGGCCCTGGA GGAGAAGCTG AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC	100
GATATCGCGG CC	112

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 2:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 266 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 2:

AAGCTTGAAT TCGTTAACAT GTCCACGGCC CCCCCGACCG ATGTCAGCCT	50
GGGGGACGAG CTCCACTTAG ACGGCGAGGA CGTGGCGATG GCGCATGCCG	100
ACGCFCTAGA CGATTTTCGAT CTGGACATGT TGGGGGACGG GGATTCCCCG	150
GGGCCGGGAT TTACCCCCCA CGACTCCGCC CCCTACGGCG CTCTGGATAT	200
GGCCGACTTC GAGTTTGAGC AGATGTTTAC CGATGCCCTT GGAATTGACG	250
AGTACGGTGG TCGACC	266

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 3:

(i) charakteristika sekvence:

- (A) délka: 76 párů bází
- (B) typ: nukleotid
- (C) počet vláken: jedno
- (D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 3:

TCGAGCCTGC AGCCTAGAGC CTTCCAAGCC CTCATGAAGG AGGAAAGCCC	50
AAACTGCTAG TGAGGATCCG CGGCCG	76

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 4:

(i) charakteristika sekvence:

- (A) délka: 788 párů bází
- (B) typ: nukleotid
- (C) počet vláken: jedno
- (D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 4:

GGGAAGCTTG GGCCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCTA CACCGGCGGC	50
CCCTGCACCA GCCCCCTCCT GGCCCTGTC ATCTTCTGTC CCTTCCCAGA	100

AAACCTACCA	GGGCAGCTAC	GGTTTCCGTC	TGGGCTTCTT	GCATTCTGGG	150
ACAGCCAAGT	CTGTGACTTG	CACGTACTCC	CCTGCCCTCA	ACAAGATGTT	200
TTGCCAACTG	GCCAAGACCT	GCCCTGTGCA	GCTGTGGGTT	GATTCCACAC	250
CCCCGCCCGG	CACCCGCGTC	CGCGCCATGG	CCATCTACAA	GCAGTCACAG	300
CACATGACGG	AGGTTGTGAG	GCGCTGCCCC	CACCATGAGC	GCTGCTCAGA	350
TAGCGATGGT	CTGGCCCCTC	CTCAGCATCT	TATCCGAGTG	GAAGGAAATT	400
TGCGTGTGGA	GTATTTGGAT	GACAGAAACA	CTTTTCGACA	TAGTGTGGTG	450
GTGCCCTATG	AGCCGCCTGA	GGTTGGCTCT	GACTGTACCA	CCATCCACTA	500
CAACTACATG	TGTAACAGTT	CCTGCATGGG	CGGCATGAAC	CGGAGGCCCA	550
TCCTCACCAT	CATCACACTG	GAAGACTCCA	GTGGTAATCT	ACTGGGACGG	600
AACAGCTTTG	AGGTGCGTGT	TTGTGCCTGT	CCTGGGAGAG	ACCGGCGCAC	650
AGAGGAAGAG	AATCTCCGCA	AGAAAGGGGA	GCCTCACCAC	GAGCTGCCCC	700
CAGGGAGCAC	TAAGCGAGCA	CTGCCCAACA	ACACCAGCTC	CTCTCCCCAG	750
CCAAAGAAGA	AACCACTGGA	TGGGGATCCG	CGGCCGCC		788

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 5:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 821 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 5:

GGGAAGCTTG	GGCCGGGTCG	ACCTGCACCA	GCAGCTCCTA	CACCGGCGGC	50
CCCTGCACCA	GCCCCCTCCT	GGCCCCTGTC	ATCTTCTGTC	CCTTCCCAGA	100
AAACCTACCA	GGGCAGCTAC	GGTTTCCGTC	TGGGCTTCTT	GCATTCTGGG	150
ACAGCCAAGT	CTGTGACTTG	CACGTACTCC	CCTGCCCTCA	ACAAGATGTT	200
TTGCCAACTG	GCCAAGACCT	GCCCTGTGCA	GCTGTGGGTT	GATTCCACAC	250

CCCCGCCCCG	CACCCGCGTC	CGCGCCATGG	CCATCTACAA	GCAGTCACAG	300
CACATGACGG	AGGTTGTGAG	GCGCTGCCCC	CACCATGAGC	GCTGCTCAGA	350
TAGCGATGGT	CTGGCCCCTC	CTCAGCATCT	TATCCGAGTG	GAAGGAAATT	400
TGCGTGTGGA	GTATTTGGAT	GACAGAAACA	CTTTTCGACA	TAGTGTGGTG	450
GTGCCCTATG	AGCCGCCTGA	GGTTGGCTCT	GACTGTACCA	CCATCCACTA	500
CAACTACATG	TGTAACAGTT	CCTGCATGGG	CGGCATGAAC	CGGAGGCCCA	550
TCCTCACCAT	CATCACACTG	GAAGACTCCA	GTGGTAATCT	ACTGGGACGG	600
AACAGCTTTG	AGGTGCGTGT	TTGTGCCTGT	CCTGGGAGAG	ACCGGCGCAC	650
AGAGGAAGAG	AATCTCCGCA	AGAAAGGGGA	GCCTCACCAC	GAGCTGCCCC	700
CAGGGAGCAC	TAAGCGAGCA	CTGCCCAACA	ACACCAGCTC	CTCTCCCCAG	750
CCAAAGAAGA	AACCACTGGA	TGGAGAATAT	TTCACCCTTC	AGATCCGTGG	800
GCGTGAGGAT	CCGCGGCCGC	C			821

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 6:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 15 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 6:

ATGGAGGAGC CGCAG

15

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 7:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 42 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 7:

GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGTCTGA GTCAGGCCCT TC 42

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 8:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 36 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 8:

GGCGGCCGCG ATATCGATTC ATCAGCTCGA GTGAGC 36

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 9:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 43 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 9:

TCGAGCCTGC AGCCTAGAGC CTTCCAAGCC CTCATGAAGG AGG 43

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 10:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 31 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 10:

AAAGCCCAA CTGCTGATGA ATCGATATCG C 31

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 11:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 30 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 11:

TGAGGGCTTG GAAGGCTCTA GGCTGCAGGC

30

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 12:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 44 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 12:

GGCCGCGATA TCGATTCATC AGCAGTTTGG GCTTTCCTCC TTCA

44

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 13:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 39 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 13:

GGGAAGCTTG GGCCGGGTCG ACCTGCACCA GCAGCTCCT

39

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 14:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 32 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 14:

GGCGGCCGCG GATCCCCATC CAGTGGTTTC TT

32

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 15:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 32 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 15:

ATCTGAATGG CGCTC

15

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 16:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 32 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 16:

GGCGGCCGCG GATCCTCACG CCCACGGATC TG

32

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 17:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 39 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 17:

AAGCTTGAAT TCGTTAACAT GTCCACGGCC CCCCCGACC

39

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 18:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 23 párů bází

- (B) typ: nukleotid
- (C) počet vláken: jedno
- (D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 18:

GGTCGACCAC CGTACTCGTC AAT

23

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 19:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 33 párů básí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 19:

GATCTGAAGG CCCTCAAGGA GAAGCTGAAG GCC

33

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 20:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 36 párů básí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 20:

CTGGAGGAGA AGCTGAAGGC CCTGGAGGAG AAGCTG

36

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 21:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 38 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 21:

AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC

38

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 22:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 42 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 22:

AAGGCACTAG TGGGGGAGCG ATGATGAATC GATATCGC

38

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 23:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 42 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 23:

TAGTGCCTTC AGCTTCTCCT CCAGGGCCTT CAGCTT

36

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 24:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 33 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 24:

GGCCGCGATA TCGATTCATC ATCGCTCCCC CAG 33

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 25:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1095 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1095

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 25:

ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GAC AGC CTG GGG GAC GAG	42
Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu	
1 5 10	
CTC CAC TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC	84
Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp	
15 20 25	
GCG CTA GAC GAT TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT	126
Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp	
30 35 40	
TCC CCG GGG CCG GGA TTT ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC	168
Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr	
45 50 55	
GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC GAG TTT GAG CAG ATG TTT	210

Gly	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	
			60					65				70		
ACC	GAT	GCC	CTT	GGA	ATT	GAC	GAG	TAC	GGT	GGT	CGA	CCT	GCA	252
Thr	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	Gly	Arg	Pro	Ala	
			75					80						
CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	CCT	ACA	CCA	GCC	CCC	TCC	294
Pro	Ala	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	
85				90				95						
TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	AAA	ACC	TAC	CAG	336
Trp	Pro	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Gln	Lys	Thr	Tyr	Gln	
	100			105				110						
GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	378
Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	
	115			120				125						
GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	420
Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	
			130					135				140		
ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	462
Met	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	
			145					150						
GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	TCG	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	504
Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	
155				160				165						
GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	TCG	GAG	GTT	GTG	AGG	546
Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	
	170			175				180						
CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	CTG	588
Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	Asp	Gly	Leu	
			185					190				195		
GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	TTG	CGT	630
Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Leu	Arg	
			200					205				210		
GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
			215					220						

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 26:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1128 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1128

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 26:

ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
370 375 380	
TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
385 390 395	
TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
400 405 410	
ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
415 420 425	
GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
430 435 440 445	
GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
450 455 460	
CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
465 470 475	

GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	GGG	ACA	GCC	AAG	384
Gly	Ser	Tyr	Gly	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Leu	His	Ser	Gly	Thr	Ala	Lys	
		480					485					490				
TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	ATG	TTT	TGC	CAA	432
Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Lys	Met	Phe	Cys	Gln	
	495					500					505					
CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	TCC	ACA	CCC	CCG	480
Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Asp	Ser	Thr	Pro	Pro	
510					515					520					525	
CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	CAG	TCA	CAG	CAC	528
Pro	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	Tyr	Lys	Gln	Ser	Gln	His	
				530					535					540		
ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
			545					550					555			
AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
		560					565					570				
TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
	575					580					585					
GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	720
Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	
590					595					600					605	
CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	768
His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	
				610					615					620		
AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	816
Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	
			625					630					635			
CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	864
Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
		640					645					650				
GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	
	655					660					665					
CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
670					675					680					685	
AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	1008
Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	
				690					695					700		
ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	GAT	CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	1056
Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	
			705				710						715			
CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	1104
Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	
		720					725					730				

GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA
 Ala Leu Val Gly Glu Arg * *
 735 740

1128

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 27:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 765 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

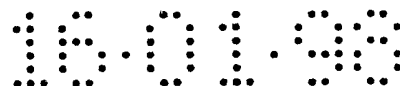
(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...765

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 27:

ATG	TCC	ACG	GCC	CCC	CCG	ACC	GAT	GTC	AGC	CTG	GGG	GAC	GAG	CTC	CAC	48
Met	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	
			380					385					390			
TTA	GAC	GGC	GAG	GAC	GTG	GCG	ATG	GCG	CAT	GCC	GAC	GCG	CTA	GAC	GAT	96
Leu	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Met	Ala	His	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Asp	
		395					400					405				
TTC	GAT	CTG	GAC	ATG	TTG	GGG	GAC	GGG	GAT	TCC	CCG	GGG	CCG	GGA	TTT	144
Phe	Asp	Leu	Asp	Met	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Phe	
	410					415					420					
ACC	CCC	CAC	GAC	TCC	GCC	CCC	TAC	GGC	GCT	CTG	GAT	ATG	GCC	GAC	TTC	192
Thr	Pro	His	Asp	Ser	Ala	Pro	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asp	Met	Ala	Asp	Phe	
425					430					435					440	
GAG	TTT	GAG	CAG	ATG	TTT	ACC	GAT	GCC	CTT	GGA	ATT	GAC	GAG	TAC	GGT	240
Glu	Phe	Glu	Gln	Met	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Glu	Tyr	Gly	
			445					450					455			



GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	288
460 465 470	
CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	336
475 480 485	
GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	384
490 495 500	
TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	432
505 510 515 520	
CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	480
525 530 535	
CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	528
540 545 550	
ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp	576
555 560 565	
AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn	624
570 575 580	
TTG CGT GTG GAG TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC Leu Arg Val Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe	672
585 590 595 600	
GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln	720
605 610 615	
GCT GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCG AGC TGA TGA Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser * *	765
620 625 630	

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 28:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 816 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...816

(xi) popis sekvence; SEQ ID NO 28

ATG TCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
Met Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
260 265 270	
TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
275 280 285	
TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
290 295 300	
ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
305 310 315	
GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
320 325 330 335	
GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
340 345 350	
CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
355 360 365	
GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG	384
Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	
370 375 380	
TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA	432
Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	
385 390 395	
CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG	480
Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	
400 405 410 415	
CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC	528
Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	
420 425 430	

ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	CGC	TGC	TCA	GAT	576
Met	Thr	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	His	Glu	Arg	Cys	Ser	Asp	
			435					440					445			
AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
		450					455					460				
TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	672
Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Phe	Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	
	465					470					475					
GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	720
Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Leu	Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	
	480				485					490					495	
GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCG	AGC	CTG	CAG	CCT	768
Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
				500					505					510		
AGA	GCC	TTC	CAA	GCC	CTC	ATG	AAG	GAG	GAA	AGC	CCA	AAC	TGC	TGA	TGA	816
Arg	Ala	Phe	Gln	Ala	Leu	Met	Lys	Glu	Glu	Ser	Pro	Asn	Cys	*	*	
			515					520					525			

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 29:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1209 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1209

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 29:

ATG	TCC	ACG	GCC	CCC	CCG	ACC	GAT	GTC	AGC	CTG	GGG	GAC	GAG	CTC	CAC	48
Met	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Thr	Asp	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	
		275					280					285				

TTA Leu 290	GAC Asp Gly	GGC Glu Glu	GAG Asp Glu	GAC Asp Asp	GTG Val Val	GCG Ala Ala	ATG Met Met	GCG Ala Ala	CAT His His	GCC Ala Ala	GAC Asp Asp	GCG Ala Ala	CTA Leu Leu	GAC Asp Asp	GAT Asp Asp	96
TTC Phe 305	GAT Asp Leu	CTG Leu Leu	GAC Asp Asp	ATG Met Met	TTG Leu Leu	GGG Gly Gly	GAC Asp Asp	GGG Gly Gly	GAT Asp Asp	TCC Ser Ser	CCG Pro Pro	GGG Gly Gly	CCG Pro Pro	GGA Gly Gly	TTT Phe Phe	144
ACC Thr 305	CCC Pro Pro	CAC His His	GAC Asp Asp	TCC Ser Ser	GCC Ala Ala	CCC Pro Pro	TAC Tyr Tyr	GGC Gly Gly	GCT Ala Ala	CTG Leu Leu	GAT Asp Asp	ATG Met Met	GCC Ala Ala	GAC Asp Asp	TTC Phe Phe	192
GAG Glu 340	TTT Phe Phe	GAG Glu Glu	CAG Gln Gln	ATG Met Met	TTT Phe Phe	ACC Thr Thr	GAT Asp Asp	GCC Ala Ala	CTT Leu Leu	GGA Gly Gly	ATT Ile Ile	GAC Asp Asp	GAG Glu Glu	TAC Tyr Tyr	GGT Gly Gly	240
GGT Gly 355	CGA Arg Arg	CCT Pro Pro	GCA Ala Ala	CCA Pro Pro	GCA Ala Ala	GCT Ala Ala	CCT Pro Pro	ACA Thr Thr	CCG Pro Pro	GCG Ala Ala	GCC Ala Ala	CCT Pro Pro	GCA Ala Ala	CCA Pro Pro	GCC Ala Ala	288
CCC Pro 370	TCC Ser Ser	TGG Trp Trp	CCC Pro Pro	CTG Leu Leu	TCA Ser Ser	TCT Ser Ser	TCT Ser Ser	GTC Val Val	CCT Pro Pro	TCC Ser Ser	CAG Gln Gln	AAA Lys Lys	ACC Thr Thr	TAC Tyr Tyr	CAG Gln Gln	336
GGC Gly 385	AGC Ser Ser	TAC Tyr Tyr	GGT Gly Gly	TTC Phe Phe	CGT Arg Arg	CTG Leu Leu	GGC Gly Gly	TTC Phe Phe	TTG Leu Leu	CAT His His	TCT Ser Ser	GGG Gly Gly	ACA Thr Thr	GCC Ala Ala	AAG Lys Lys	384
TCT Ser 405	GTG Val Val	ACT Thr Thr	TGC Cys Cys	ACG Thr Thr	TAC Tyr Tyr	TCC Ser Ser	CCT Pro Pro	GCC Ala Ala	CTC Leu Leu	AAC Asn Asn	AAG Lys Lys	ATG Met Met	TTT Phe Phe	TGC Cys Cys	CAA Gln Gln	432
CTG Leu 420	GCC Ala Ala	AAG Lys Lys	ACC Thr Thr	TGC Cys Cys	CCT Pro Pro	GTG Val Val	CAG Gln Gln	CTG Leu Leu	TGG Trp Trp	GTT Val Val	GAT Asp Asp	TCC Ser Ser	ACA Thr Thr	CCC Pro Pro	CCG Pro Pro	480
CCC Pro 435	GGC Gly Gly	ACC Thr Thr	CGC Arg Arg	GTC Val Val	CGC Arg Arg	GCC Ala Ala	ATG Met Met	GCC Ala Ala	ATC Ile Ile	TAC Tyr Tyr	AAG Lys Lys	CAG Gln Gln	TCA Ser Ser	CAG Gln Gln	CAC His His	528
ATG Met 450	ACG Thr Thr	GAG Glu Glu	GTT Val Val	GTG Val Val	AGG Arg Arg	CGC Arg Arg	TGC Cys Cys	CCC Pro Pro	CAC His His	CAT His His	GAG Glu Glu	CGC Arg Arg	TGC Cys Cys	TCA Ser Ser	GAT Asp Asp	576
AGC Ser 465	GAT Asp Asp	GGT Gly Gly	CTG Leu Leu	GCC Ala Ala	CCT Pro Pro	CCT Pro Pro	CAG Gln Gln	CAT His His	CTT Leu Leu	ATC Ile Ile	CGA Arg Arg	GTG Val Val	GAA Glu Glu	GGA Gly Gly	AAT Asn Asn	624
TTG Leu 485	CGT Arg Arg	GTG Val Val	GAG Glu Glu	TAT Tyr Tyr	TTG Leu Leu	GAT Asp Asp	GAC Asp Asp	AGA Arg Arg	AAC Asn Asn	ACT Thr Thr	TTT Phe Phe	CGA Arg Arg	CAT His His	AGT Ser Ser	GTG Val Val	672
GTG Val 500	GTG Val Val	CCC Pro Pro	TAT Tyr Tyr	GAG Glu Glu	CCG Pro Pro	CCT Pro Pro	GAG Glu Glu	GTT Val Val	GGC Gly Gly	TCT Ser Ser	GAC Asp Asp	TGT Cys Cys	ACC Thr Thr	ACC Thr Thr	ATC Ile Ile	720
CAC His 515	TAC Tyr Tyr	AAC Asn Asn	TAC Tyr Tyr	ATG Met Met	TGT Cys Cys	AAC Asn Asn	AGT Ser Ser	TCC Ser Ser	TGC Cys Cys	ATG Met Met	GGC Gly Gly	GGC Gly Gly	ATG Met Met	AAC Asn Asn	CGG Arg Arg	768

AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	816
Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	
	530						535				540					
CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	864
Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
	545				550					555					560	
GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	
				565					570					575		
CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
			580					585					590			
AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	1008
Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	
		595					600					605				
ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	1056
Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Leu	
	610					615					620					
AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	GGG	AAG	GAG	CCA	GGG	1104
Asn	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Ala	Gln	Ala	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	
	625				630				635						640	
GGG	AGC	AGG	GCT	CAC	TCC	AGC	CAC	CTG	AAG	TCC	AAA	AAG	GGT	CAG	TCT	1152
Gly	Ser	Arg	Ala	His	Ser	Ser	His	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Gln	Ser	
				645					650					655		
ACC	TCC	CGC	CAT	AAA	AAA	CTC	ATG	TTC	AAG	ACA	GAA	GGG	CCT	GAC	TCA	1200
Thr	Ser	Arg	His	Lys	Lys	Leu	Met	Phe	Lys	Thr	Glu	Gly	Pro	Asp	Ser	
			660					665						670		
GAC	TGA	TGA														1209
Asp	*	*														
			675													

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 30:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1149 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimeidiátorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1149

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 30:

ATG GCC ACG GCC CCC CCG ACC GAT GTC AGC CTG GGG GAC GAG CTC CAC	48
Met Ala Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His	
1 5 10 15	
TTA GAC GGC GAG GAC GTG GCG ATG GCG CAT GCC GAC GCG CTA GAC GAT	96
Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp	
20 25 30	
TTC GAT CTG GAC ATG TTG GGG GAC GGG GAT TCC CCG GGG CCG GGA TTT	144
Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe	
35 40 45	
ACC CCC CAC GAC TCC GCC CCC TAC GGC GCT CTG GAT ATG GCC GAC TTC	192
Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe	
50 55 60	
GAG TTT GAG CAG ATG TTT ACC GAT GCC CTT GGA ATT GAC GAG TAC GGT	240
Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly	
65 70 75 80	
GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC	288
Gly Arg Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala	
85 90 95	
CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG	336
Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln	
100 105 110	
GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG	384
Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys	
115 120 125	
TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA	432
Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln	
130 135 140	
CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG	480
Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro	
145 150 155 160	
CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC	528
Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His	
165 170 175	
ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT	576
Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp	
180 185 190	

AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	GTG	GAA	GGA	AAT	624
Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	
		195					200					205				
TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	672
Leu	Arg	Val	Glu	Tyr	Leu	Asp	Asp	Arg	Asn	Thr	Phe	Arg	His	Ser	Val	
	210					215					220					
GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	720
Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Asp	Cys	Thr	Thr	Ile	
225					230					235					240	
CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	768
His	Tyr	Asn	Tyr	Met	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly	Gly	Met	Asn	Arg	
				245					250					255		
AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	816
Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	
			260					265					270			
CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	864
Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala	Cys	Pro	Gly	Arg	
		275					280					285				
GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	912
Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Arg	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	His	
	290					295					300					
CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	960
His	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Ala	Leu	Pro	Asn	Asn	Thr	
305					310					315					320	
AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	CTG	GAT	GGA	GAA	TAT	TTC	1008
Ser	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	Gly	Glu	Tyr	Phe	
			325						330					335		
ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	ATG	TTC	CGA	GAG	GAT	1056
Thr	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Phe	Glu	Met	Phe	Arg	Glu	Asp	
			340				345						350			
CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	1104
Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	
		355					360					365				
GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	CGA	TGA	TGA		1149
Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Arg	*	*		
	370					375					380					

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 31:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1611 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1611

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 31:

ATG	GCC	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCA	GGG	GCA	GAG	CTT	GTG	GGG	TCA	48
MET	ALA	GLN	VAL	GLN	LEU	GLN	GLU	SER	GLY	ALA	GLU	LEU	VAL	GLY	SER	
1				5					10					15		
GGG	GCC	TCA	GTC	AAG	TTG	TCC	TGC	ACA	GCT	TCT	GGC	TTC	AAC	ATT	AAA	96
GLY	ALA	SER	VAL	LYS	LEU	SER	CYS	THR	ALA	SER	GLY	PHE	ASN	ILE	LYS	
			20					25					30			
GAC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GAA	CAG	GGC	CTG	GAG	144
ASP	TYR	TYR	MET	HIS	TRP	VAL	LYS	GLN	ARG	PRO	GLU	GLN	GLY	LEU	GLU	
		35					40					45				
TGG	ATT	GGA	TGG	ATT	GAT	CCT	GAG	AAT	GGT	GAT	ACT	GAA	TAT	GCC	CCG	192
TRP	ILE	GLY	TRP	ILE	ASP	PRO	GLU	ASN	GLY	ASP	THR	GLU	TYR	ALA	PRO	
	50					55					60					
AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	ACT	ATG	ACT	GCA	GAC	ACA	TCC	TCC	AAT	ACA	240
LYS	PHE	GLN	GLY	LYS	ALA	THR	MET	THR	ALA	ASP	THR	SER	SER	ASN	THR	
	65				70				75						80	
GCC	TAC	CTG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	GCA	TCT	GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	288
ALA	TYR	LEU	GLN	LEU	SER	SER	LEU	ALA	SER	GLU	ASP	THR	ALA	VAL	TYR	
				85					90					95		
TAT	TGT	AAT	TTT	TAC	GGG	GAT	GCT	TTG	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACC	336
TYR	CYS	ASN	PHE	TYR	GLY	ASP	ALA	LEU	ASP	TYR	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	
			100					105					110			
ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA	GGT	GGA	GGC	GGT	TCA	GGC	GGA	GGT	GGC	TCT	384
THR	VAL	THR	VAL	SER	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	SER	
		115					120					125				
GGC	GGT	GGC	GGA	TCG	GAT	GTT	TTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	ACT	TTG	432
GLY	GLY	GLY	GLY	SER	ASP	VAL	LEU	MET	THR	GLN	THR	PRO	LEU	THR	LEU	
	130					135					140					
TCG	GTT	ACC	ATT	GGA	CAA	CCA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	480
SER	VAL	THR	ILE	GLY	GLN	PRO	ALA	SER	ILE	SER	CYS	LYS	SER	SER	GLN	
145					150					155					160	

AGC CTC TTG GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG	528
SER LEU LEU ASP SER ASP GLY LYS THR TYR LEU ASN TRP LEU LEU GLN	
165 170 175	
AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG	576
ARG PRO GLY GLN SER PRO LYS ARG LEU ILE TYR LEU VAL SER LYS LEU	
180 185 190	
GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT	624
ASP SER GLY VAL PRO ASP ARG PHE THR GLY SER GLY SER GLY THR ASP	
195 200 205	
TTC ACA CTG AAA ATC AAC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT	672
PHE THR LEU LYS ILE ASN ARG VAL GLU ALA GLU ASP LEU GLY VAL TYR	
210 215 220	
TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TCT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC	720
TYR CYS TRP GLN GLY THR HIS SER PRO LEU THR PHE GLY ALA GLY THR	
225 230 235 240	
AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCA TTG CAG ACG CGT CGA CCT GCA	768
LYS LEU GLU LEU LYS ARG ALA ALA ALA LEU GLN THR ARG ARG PRO ALA	
245 250 255	
CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC	816
PRO ALA ALA PRO THR PRO ALA ALA PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO	
260 265 270	
CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT	864
LEU SER SER SER VAL PRO SER GLN LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY	
275 280 285	
TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC	912
PHE ARG LEU GLY PHE LEU HIS SER GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS	
290 295 300	
ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC	960
THR TYR SER PRO ALA LEU ASN LYS MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR	
305 310 315 320	
TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC	1008
CYS PRO VAL GLN LEU TRP VAL ASP SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG	
325 330 335	
GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT	1056
VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL	
340 345 350	
GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG	1104
VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU	
355 360 365	
GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG	1152
ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU	
370 375 380	
TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT	1200
TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR	
385 390 395 400	

GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC	1248
GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR	
405 410 415	
ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC	1296
MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU	
420 425 430	
ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC	1344
THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN	
435 440 445	
AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA	1392
SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR	
450 455 460	
GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC	1440
GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO	
465 470 475 480	
CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC	1488
PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO	
485 490 495	
CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG	1536
GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU	
500 505 510	
AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG	1584
LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU	
515 520 525	
AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA TGA	1611
LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG * *	
530 535	

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 32:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1065 párů básí

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1065

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 32:

ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG	48
MET GLY GLU TYR PHE THR LEU GLN ILE ARG GLY ARG GLU ARG PHE GLU	
1 5 10 15	
ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT	96
MET PHE ARG GLU LEU ASN GLU ALA LEU GLU LEU LYS ASP ALA GLN ALA	
20 25 30	
GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCC AGC CAC CTG AAG TCC	144
GLY LYS GLU PRO GLY GLY SER ARG ALA HIS SER SER HIS LEU LYS SER	
35 40 45	
AAA AAG GGT CAG TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG TTC AAG ACA	192
LYS LYS GLY GLN SER THR SER ARG HIS LYS LYS LEU MET PHE LYS THR	
50 55 60	
GAA GGG CCT GAC TCA GAC GGT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG	240
GLU GLY PRO ASP SER ASP GLY ARG PRO ALA PRO ALA ALA PRO THR PRO	
65 70 75 80	
GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT	288
ALA ALA PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO LEU SER SER SER VAL PRO	
85 90 95	
TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG	336
SER GLN LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY PHE ARG LEU GLY PHE LEU	
100 105 110	
CAT TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC	384
HIS SER GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS THR TYR SER PRO ALA LEU	
115 120 125	
AAC AAG ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG	432
ASN LYS MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR CYS PRO VAL GLN LEU TRP	
130 135 140	
GTT GAT TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC	480
VAL ASP SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE	
145 150 155 160	
TAC AAG CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC	528
TYR LYS GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS	
165 170 175	
CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT	576
HIS GLU ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU	
180 185 190	
ATC CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC	624
ILE ARG VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN	
195 200 205	

ACT	TTT	CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	672
THR	PHE	ARG	HIS	SER	VAL	VAL	VAL	PRO	TYR	GLU	PRO	PRO	GLU	VAL	GLY	
	210					215					220					
TCT	GAC	TGT	ACC	ACC	ATC	CAC	TAC	AAC	TAC	ATG	TGT	AAC	AGT	TCC	TGC	720
SER	ASP	CYS	THR	THR	ILE	HIS	TYR	ASN	TYR	MET	CYS	ASN	SER	SER	CYS	
	225				230					235					240	
ATG	GGC	GGC	ATG	AAC	CGG	AGG	CCC	ATC	CTC	ACC	ATC	ATC	ACA	CTG	GAA	768
MET	GLY	GLY	MET	ASN	ARG	ARG	PRO	ILE	LEU	THR	ILE	ILE	THR	LEU	GLU	
				245					250					255		
GAC	TCC	AGT	GGT	AAT	CTA	CTG	GGA	CGG	AAC	AGC	TTT	GAG	GTG	CGT	GTT	816
ASP	SER	SER	GLY	ASN	LEU	LEU	GLY	ARG	ASN	SER	PHE	GLU	VAL	ARG	VAL	
			260					265					270			
TGT	GCC	TGT	CCT	GGG	AGA	GAC	CGG	CGC	ACA	GAG	GAA	GAG	AAT	CTC	CGC	864
CYS	ALA	CYS	PRO	GLY	ARG	ASP	ARG	ARG	THR	GLU	GLU	GLU	ASN	LEU	ARG	
	275						280					285				
AAG	AAA	GGG	GAG	CCT	CAC	CAC	GAG	CTG	CCC	CCA	GGG	AGC	ACT	AAG	CGA	912
LYS	LYS	GLY	GLU	PRO	HIS	HIS	GLU	LEU	PRO	PRO	GLY	SER	THR	LYS	ARG	
	290					295					300					
GCA	CTG	CCC	AAC	AAC	ACC	AGC	TCC	TCT	CCC	CAG	CCA	AAG	AAG	AAA	CCA	960
ALA	LEU	PRO	ASN	ASN	THR	SER	SER	SER	PRO	GLN	PRO	LYS	LYS	LYS	PRO	
	305				310					315					320	
CTG	GAT	GGG	GAT	CTG	AAG	GCC	CTC	AAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	1008
LEU	ASP	GLY	ASP	LEU	LYS	ALA	LEU	LYS	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	
				325					330					335		
GAG	AAG	CTG	AAG	GCC	CTG	GAG	GAG	AAG	CTG	AAG	GCA	CTA	GTG	GGG	GAG	1056
GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	GLU	GLU	LYS	LEU	LYS	ALA	LEU	VAL	GLY	GLU	
			340					345					350			
CGA	TGA	TGA														1065
ARG	*	*														
		355														

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 33:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 963 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...963

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 33:

ATG	GGA	GAA	TAT	TTC	ACC	CTT	CAG	ATC	CGT	GGG	CGT	GAG	CGC	TTC	GAG	48
MET	GLY	GLU	TYR	PHE	THR	LEU	GLN	ILE	ARG	GLY	ARG	GLU	ARG	PHE	GLU	
1				5				10				15				
ATG	TTC	CGA	GAG	CTG	AAT	GAG	GCC	TTG	GAA	CTC	AAG	GAT	GCC	CAG	GCT	96
MET	PHE	ARG	GLU	LEU	ASN	GLU	ALA	LEU	GLU	LEU	LYS	ASP	ALA	GLN	ALA	
			20					25					30			
GGG	AAG	GAG	CCA	GGT	CGA	CCT	GCA	CCA	GCA	GCT	CCT	ACA	CCG	GCG	GCC	144
GLY	LYS	GLU	PRO	GLY	ARG	PRO	ALA	PRO	ALA	ALA	PRO	THR	PRO	ALA	ALA	
			35				40					45				
CCT	GCA	CCA	GCC	CCC	TCC	TGG	CCC	CTG	TCA	TCT	TCT	GTC	CCT	TCC	CAG	192
PRO	ALA	PRO	ALA	PRO	SER	TRP	PRO	LEU	SER	SER	SER	VAL	PRO	SER	GLN	
	50					55						60				
AAA	ACC	TAC	CAG	GGC	AGC	TAC	GGT	TTC	CGT	CTG	GGC	TTC	TTG	CAT	TCT	240
LYS	THR	TYR	GLN	GLY	SER	TYR	GLY	PHE	ARG	LEU	GLY	PHE	LEU	HIS	SER	
	65				70					75				80		
GGG	ACA	GCC	AAG	TCT	GTG	ACT	TGC	ACG	TAC	TCC	CCT	GCC	CTC	AAC	AAG	288
GLY	THR	ALA	LYS	SER	VAL	THR	CYS	THR	TYR	SER	PRO	ALA	LEU	ASN	LYS	
				85					90					95		
ATG	TTT	TGC	CAA	CTG	GCC	AAG	ACC	TGC	CCT	GTG	CAG	CTG	TGG	GTT	GAT	336
MET	PHE	CYS	GLN	LEU	ALA	LYS	THR	CYS	PRO	VAL	GLN	LEU	TRP	VAL	ASP	
			100					105					110			
TCC	ACA	CCC	CCG	CCC	GGC	ACC	CGC	GTC	CGC	GCC	ATG	GCC	ATC	TAC	AAG	384
SER	THR	PRO	PRO	PRO	GLY	THR	ARG	VAL	ARG	ALA	MET	ALA	ILE	TYR	LYS	
			115				120					125				
CAG	TCA	CAG	CAC	ATG	ACG	GAG	GTT	GTG	AGG	CGC	TGC	CCC	CAC	CAT	GAG	432
GLN	SER	GLN	HIS	MET	THR	GLU	VAL	VAL	ARG	ARG	CYS	PRO	HIS	HIS	GLU	
	130					135					140					
CGC	TGC	TCA	GAT	AGC	GAT	GGT	CTG	GCC	CCT	CCT	CAG	CAT	CTT	ATC	CGA	480
ARG	CYS	SER	ASP	SER	ASP	GLY	LEU	ALA	PRO	PRO	GLN	HIS	LEU	ILE	ARG	
	145				150					155					160	
GTG	GAA	GGA	AAT	TTG	CGT	GTG	GAG	TAT	TTG	GAT	GAC	AGA	AAC	ACT	TTT	528
VAL	GLU	GLY	ASN	LEU	ARG	VAL	GLU	TYR	LEU	ASP	ASP	ARG	ASN	THR	PHE	
				165					170					175		
CGA	CAT	AGT	GTG	GTG	GTG	CCC	TAT	GAG	CCG	CCT	GAG	GTT	GGC	TCT	GAC	576
ARG	HIS	SER	VAL	VAL	VAL	PRO	TYR	GLU	PRO	PRO	GLU	VAL	GLY	SER	ASP	
			180					185					190			

TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC	624
CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY	
195 200 205	
GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC	672
GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER	
210 215 220	
AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC	720
SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA	
225 230 235 240	
TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA	768
CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS	
245 250 255	
GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG	816
GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU	
260 265 270	
CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT	864
PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP	
275 280 285	
GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG	912
GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS	
290 295 300	
CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA	960
LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG *	
305 310 315 320	
TGA	963
*	

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 34:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 1011 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

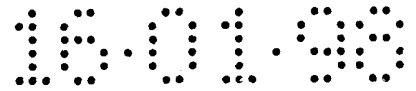
(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS



(B) umístění: 1...1011

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 34

ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG CGC TTC GAG	48
MET GLY GLU TYR PHE THR LEU GLN ILE ARG GLY ARG GLU ARG PHE GLU	
1 5 10 15	
ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT GCC CAG GCT	96
MET PHE ARG GLU LEU ASN GLU ALA LEU GLU LEU LYS ASP ALA GLN ALA	
20 25 30	
GGG AAG GAG CCA GGT CGA GGA GGT GGT GGC TCT GGA GGC GGA GGA TCC	144
GLY LYS GLU PRO GLY ARG GLY GLY GLY GLY SER GLY GLY GLY SER	
35 40 45	
GGC GGT GGA GGT TCT CGA CCT GCA CCA GCA GCT CCT ACA CCG GCG GCC	192
GLY GLY GLY GLY SER ARG PRO ALA PRO ALA ALA PRO THR PRO ALA ALA	
50 55 60	
CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT GTC CCT TCC CAG	240
PRO ALA PRO ALA PRO SER TRP PRO LEU SER SER SER VAL PRO SER GLN	
65 70 75 80	
AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC TTC TTG CAT TCT	288
LYS THR TYR GLN GLY SER TYR GLY PHE ARG LEU GLY PHE LEU HIS SER	
85 90 95	
GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT GCC CTC AAC AAG	336
GLY THR ALA LYS SER VAL THR CYS THR TYR SER PRO ALA LEU ASN LYS	
100 105 110	
ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG CTG TGG GTT GAT	384
MET PHE CYS GLN LEU ALA LYS THR CYS PRO VAL GLN LEU TRP VAL ASP	
115 120 125	
TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG GCC ATC TAC AAG	432
SER THR PRO PRO PRO GLY THR ARG VAL ARG ALA MET ALA ILE TYR LYS	
130 135 140	
CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC CCC CAC CAT GAG	480
GLN SER GLN HIS MET THR GLU VAL VAL ARG ARG CYS PRO HIS HIS GLU	
145 150 155 160	
CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG CAT CTT ATC CGA	528
ARG CYS SER ASP SER ASP GLY LEU ALA PRO PRO GLN HIS LEU ILE ARG	
165 170 175	
GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC AGA AAC ACT TTT	576
VAL GLU GLY ASN LEU ARG VAL GLU TYR LEU ASP ASP ARG ASN THR PHE	
180 185 190	
CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG GTT GGC TCT GAC	624
ARG HIS SER VAL VAL VAL PRO TYR GLU PRO PRO GLU VAL GLY SER ASP	
195 200 205	
TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT TCC TGC ATG GGC	672
CYS THR THR ILE HIS TYR ASN TYR MET CYS ASN SER SER CYS MET GLY	
210 215 220	

GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA CTG GAA GAC TCC	720
GLY MET ASN ARG ARG PRO ILE LEU THR ILE ILE THR LEU GLU ASP SER	
225	230 235 240
AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GCC	768
SER GLY ASN LEU LEU GLY ARG ASN SER PHE GLU VAL ARG VAL CYS ALA	
	245 250 255
TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT CTC CGC AAG AAA	816
CYS PRO GLY ARG ASP ARG ARG THR GLU GLU GLU ASN LEU ARG LYS LYS	
	260 265 270
GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT AAG CGA GCA CTG	864
GLY GLU PRO HIS HIS GLU LEU PRO PRO GLY SER THR LYS ARG ALA LEU	
	275 280 285
CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG AAA CCA CTG GAT	912
PRO ASN ASN THR SER SER SER PRO GLN PRO LYS LYS LYS PRO LEU ASP	
	290 295 300
GGG GAT CTG AAG GCC CTC AAG GAG AAG CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG	960
GLY ASP LEU LYS ALA LEU LYS GLU LYS LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS	
305	310 315 320
CTG AAG GCC CTG GAG GAG AAG CTG AAG GCA CTA GTG GGG GAG CGA TGA	1008
LEU LYS ALA LEU GLU GLU LYS LEU LYS ALA LEU VAL GLY GLU ARG *	
	325 330 335
TGA	1011
*	

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 35:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 24 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...1095

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 35:

CGGATCCTCT CGGAACATCT CGAA 24

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 36:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 749 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(ix) charakteristika:

(A) jméno/CLE: CDS

(B) umístění: 1...749

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 36:

GCCATGGCCC	AGGTGCAGCT	GCAGGAGTCA	GGGGCAGAGC	TTGTGGGGTC	AGGGGCCTCA	60
GTCAAGTTGT	CCTGCACAGC	TTCTGGCTTC	AACATTAAG	ACTACTATAT	GCACTGGGTG	120
AAGCAGAGGC	CTGAACAGGG	CCTGGAGTGG	ATTGGATGGA	TTGATCCTGA	GAATGGTGAT	180
ACTGAATATG	CCCCGAAGTT	CCAGGGCAAG	GCCACTATGA	CTGCAGACAC	ATCCTCCAAT	240
ACAGCCTACC	TGCAGCTCAG	CAGCCTGGCA	TCTGAGGACA	CTGCCGTCTA	TTATTGTAAT	300
TTTTACGGGG	ATGCTTTGGA	CTACTGGGGC	CAAGGGACCA	CGGTCACCGT	CTCCTCAGGT	360
GGAGGCGGTT	CAGGCGGAGG	TGGCTCTGGC	GGTGGCGGAT	CGGATGTTTT	GATGACCCAA	420
ACTCCACTCA	CTTTGTGGT	TACCATTGGA	CAACCAGCCT	CCATCTCTTG	CAAGTCAAGT	480
CAGAGCCTCT	TGGATAGTGA	TGGAAAGACA	TATTTGAATT	GGTTGTTACA	GAGGCCAGGC	540
CAGTCTCCAA	AGCGCCTAAT	CTATCTGGTG	TCTAACTGG	ACTCTGGAGT	CCCTGACAGG	600
TTCCTGGCA	GTGGATCAGG	GACAGATTC	ACACTGAAAA	TCAACAGAGT	GGAGGCTGAG	660
GATTTGGGAG	TTTATTATTG	CTGGCAAGGT	ACACATTCTC	CGCTCACGTT	CGGTGCTGGG	720

ACCAAGCTGG AGCTGAAACG GGCGGCCGC

749

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 37:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 45 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 37:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTC A CCTT 45

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 38:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 24 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 38:

GGGTCGACCT GGCTCCTTCC CAGG 24

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 39:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 749 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 39:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTTCAGAT CCGTGGGCGT	60
GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAGGCT	120
GGGAAGGAGC CAGGTCGACC C	141

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 40:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 27 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 40:

GGGTCGACCG TCTGAGTCAG GCCCTTC

27

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 41:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 749 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 41:

AAGCTTGAAT TCGTTAACGC CACCATGGGA GAATATTTCA CCCTTCAGAT CCGTGGGCGT	60
GAGCGCTTCG AGATGTTCCG AGAGCTGAAT GAGGCCTTGG AACTCAAGGA TGCCCAGGCT	120
GGGAAGGAGC CAGGGGGGAG CAGGGCTCAC TCCAGCCACC TGAAGTCCAA AAAGGGTCAG	180
TCTACCTCCC GCCATAAAAA ACTCATGTTC AAGACAGAAG GGCCTGACTC AGACGGTCGA	240
CCC	243

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 42:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 48 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 42:

TCGAGGAGGT GGTGGCTCTG GAGGCGGAGG ATCCGGCGGT GGAGGTTC 48

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 43:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 48 párů bází

(B) typ: nukleotid

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: cDNA

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 43:

TCGAGAACCC CTACCGCCGG ATCCTCCGCC TCCAGAGCCA CCACCTCC 48

(2) Informace pro sekvenci SEQ ID NO: 44:

(i) charakteristika sekvence:

(A) délka: 16 nukleových kyselin

(B) typ: nukleová kyselina

(C) počet vláken: jedno

(D) konfigurace: lineární

(ii) typ molekuly: peptid

(iii) hypotetický: NE

(v) typ fragmentu: interní

(iii) hypotetický: NE

(iii) antimediatorová: NE

(xi) popis sekvence: SEQ ID NO 46:

AGCTTCAACA TGTTGGGACA TGGTCG 26

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Varianta proteinu p53 ve které, část domény oligomerizace stejně jako celá doména regulace je deletována a nahrazena umělou doménou leucinového zipu v y z n a č e - n á t í m, že delece části C-konce je provedena od rezidua 326 nebo od rezidua 337.

2. Varianta podle nároku 1 v y z n a č e n á t í m, že umělá doména leucinového zipu je doména nepřítomná v přírodním stavu zabezpečující oligomerizační selektivitu.

3. Varianta podle nároku 2 v y z n a č e n á t í m, že doména leucinového zipu má sekvenci SEQ ID n°1.

4. Varianta podle nároku 1 až 3 v y z n a č e n á t í m, že arginin v poloze 182 proteinu p53 je nahrazen histidinem.

5. Varianta podle jednoho z předchozích nároků, ve které část nebo celek transaktivační domény je deletován a nahrazen heterologní transaktivační doménou.

6. Varianta podle nároku 5 v y z n a č e n á t í m, že zahrnuje deleci reziduí 1 až 74.

7. Varianta podle nároku 5 nebo 6 v y z n a č e n á t í m, že heterologní transaktivační doména je transaktivační doména VP16.

8. Varianta podle nároku 7 v y z n a č e n á t í m, že transaktivační doména obsahuje sekvenci SEQ ID n°2.

9. Varianta podle nároku 5 nebo 6 v y z n a č e n á t í m, že heterologní transaktivační doména je transaktivační doména specifická transformovaným buňkám.

- 10. Varianta podle nároku 9 v y z n a č e n á t í m, že transaktivační doména je složena z proteinové domény schopné selektivně vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex přítomný v transformované buňce.

11. Varianta proteinu p53 účinná přednostně v transformovaných buňkách, ve které alespoň jedna z funkčních domén proteinu p53 je deletována zčásti nebo úplně a je nahrazena heterologní doménou účinnou přednostně v transformovaných buňkách.

12. Varianta podle nároku 11 v y z n a č e n á t í m, že deletovaná a substituovaná funkční doména proteinu p53 je transaktivační doména.

13. Varianta podle nároku 12 obsahující transaktivační doménu účinnou přednostně v buňkách obsahujících onkogenní protein ras nebo mutant proteinu p53.

14. Varianta podle nároku 13 v y z n a č e n á t í m, že transaktivační doména je proteinová doména schopná selektivně vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex

SUBSTITUTE SHEET

přítomný v transformované buňce.

15. Varianta podle nároku 14 v y z n a č e n á t í m, že proteinová doména obsahuje fragment nebo derivát protilátek, zejména Fab nebo ScFv.

16. Varianta podle nároku 15 v y z n a č e n á t í m, že proteinová doména obsahuje ScFv řízenou proti mutantu proteinu p53.

17. Varianta podle jednoho z nároků 12 až 16 v y z n a č e n á t í m, že přírodní transaktivační doména je deletována supresí reziduí 1 až 74.

18. Varianta proteinu p53 obsahující delecí části C-konce od rezidua 366 sloučená se sekvencí SEQ ID n°3 (AS).

19. Varianta podle nároku 18, ve které celek nebo část transaktivační domény je deletován a nahrazen heterologní transaktivační doménou.

20. Varianta podle nároku 18 nebo 19 v y z n a č e n á t í m, že arginin v poloze 182 proteinu p53 je nahrazen histidinem.

21. Chimérní protein obsahující transaktivační doménu, DNA vazebnou doménu, rozpoznávací jadernou doménu a doménu oligomerizace, v y z n a č e n ý t í m, že DNA vazebná doména a rozpoznávací jaderná doména jsou tvořeny

aminokyselinami 75 až 325 divokého lidského proteinu p53 (SEQ ID n°4).

22. Chimérodní protein obsahující transaktivační doménu, DNA vazebnou doménu, rozpoznávací jadernou doménu a oblast oligomerizace, v y z n a č e n ý t í m, že DNA vazebná doména a rozpoznávací jaderná doména jsou tvořeny aminokyselinami 75 až 336 divokého lidského proteinu p53 (SEQ ID n°5).

23. Chimérodní protein podle nároku 21 nebo 22 v y z n a č e n ý t í m, že arginin v poloze 182 proteinu p53 je nahrazen histidinem.

24. Chimérodní protein podle nároků 21 až 23 v y z n a č e n ý t í m, že transaktivační doména je tvořena transaktivační doménou VP16.

25. Chimérodní protein podle nároků 1 až 24 v y z n a č e n ý t í m, že transaktivační doména je tvořena proteinovou doménou schopnou selektivně vázat transaktivátor nebo transaktivační komplex přítomný v transformovaných buňkách.

26. Chimérodní protein podle nároku 21 až 25 v y z n a č e n ý t í m, že doména oligomerizace je tvořena umělým leucinovým zipem.

27. Sloučenina V-325 sekvence SEQ IN n° 25 a její varianta V-325H obsahující histidin v poloze 182 proteinu

p53.

28. Sloučenina V-326 sekvence SEQ IN n° 26 a její varianta V-326H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

29. Sloučenina V-367 sekvence SEQ IN n° 27 a její varianta V-367H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

30. Sloučenina V-AS sekvence SEQ IN n° 28 a její varianta V-ASH obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

31. Sloučenina V-393 sekvence SEQ IN n° 29 a její varianta V-393H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

32. Sloučenina V-343 sekvence SEQ IN n° 30 a její varianta V-343H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

33. Sloučenina V-325 sekvence SEQ IN n° 31 a její varianta V-325H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

34. Sloučenina 393-325 sekvence SEQ IN n° 32 a její varianta 393-325H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

SUBSTITUTE SHEET

35. Sloučenina 360-325 sekvence SEQ IN n° 33 a její varianta 360-325H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

36. Sloučenina 360h-325 sekvence SEQ IN n° 34 a její varianta 360h-325H obsahující histidin v poloze 182 proteinu p53.

37. Nukleová kyselina kódující variantu nebo chimerní protein podle nároků 1 až 36.

38. Nukleová kyselina podle nároku 37 v y z n a č e n á t í m, že se jedná o cDNA, RNA, syntetickou nebo semisyntetickou kyselinu.

39. Nukleová kyselina podle nároku 37 v y z n a č e n á t í m, že se jedná o sekvenci nukleové kyseliny vybrané mezi množinou sekvencí SEQ ID n° 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 a 34.

40. Kazeta exprese obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 37, promotor umožňující expresi a terminační signál transkripce.

41. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 37 nebo kazetu podle nároku 40.

42. Vektor podle nároku 41 v y z n a č e n ý t í m, že

se jedná o virální vektor.

43. Vektor podle nároku 42 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o rekombinantní defektní adenovirus.

44. Vektor podle nároku 42 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o rekombinantní defektní retrovirus.

45. Vektor podle nároku 42 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o rekombinantní defektní AAV.

46. Vektor podle nároku 42 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o rekombinantní defektní HSV.

47. Vektor podle nároku 41 v y z n a č e n ý t í m, že se jedná o chemický nebo biochemický vektor.

48. Farmaceutická kompozice obsahující nukleovou kyselinu nebo/a vektor podle jednoho z nároků 32 až 47.

49. Farmaceutická kompozice obsahující variantu nebo chimérní protein podle jednoho z nároků 1 až 36.

50. Farmaceutická kompozice podle jednoho z nároků 48 nebo 49 pro léčení hyperproliferativních poruch.

SUBSTITUTE SHEET