

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

403-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07. 08. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.08.96,**
18.10.96, 18.03.97

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/023541, 96/028515,**
97/040820

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/13945**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/05783**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/28
C 12 N	5/10
C 12 N	15/12
C 12 N	15/11
C 07 K	14/525
C 07 K	16/24
C 07 K	14/705
G 01 N	33/68
A 61 K	48/00
A 61 K	39/395
A 61 K	38/19

(71) Přihlášovatel:

BIOGEN, INC., Cambridge, MA, US;
 THE FACULTY OF MEDICINE OF THE
 UNIVERSITY OF GENEVA, Geneva, CH;

(72) Původce:

Chicheportiche Yves, Chene-Bougeries, CH;
 Browning Jeffrey L., Brookline, MA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

DNA kódující ligand příbuzný TNF,
způsob jeho přípravy a způsob potlačení
imunitní odpovědi

(57) Anotace:

Ligand příbuzný nádorovému nekrotickému
faktorů /TRELL/, který je novým členem rodiny
nádorového nekrotického faktoru /TNF/, a
modifikovaný TRELL, a také farmaceutické
přípravky tyto ligandy obsahující.

CZ 403-99 A3

DNA kódující ligand příbuzný TNF, způsob jeho přípravy
a způsob potlačení imunitní odpovědi

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru neboli TRELL, což je polypeptid patřící do rodiny proteinů nádorovému nekrotickému faktoru (TNF, "Tumor Necrosis Factor"). Tento protein nebo jeho receptor mohou mít protinádorové nebo imunoregulační použití. Kromě toho buňky transfekované genem kódujícím TRELL se mohou použít k protinádorové genové terapii a ke genové terapii autoimunitních a zánětlivých onemocnění a také ke genové terapii dědičných genetických poruch.

Předkládaný vynález byl vytvořen z části v průběhu práce na grantech č. 31-42275.94 a 32-41729.94, které získala Irene Garcia od Swiss National Fund. Výhradní práva jsou definována v odstavcích 28 a 29 statutu Swiss National Fund.

Dosavadní stav techniky

Cytokiny příbuzné nádorovému nekrotickému faktoru (TNF) jsou mediátory hostitelské obranné reakce a regulace imunitní odpovědi. Členové této proteinové rodiny se vyskytují ve formě ukotvené na buněčnou membránu a působí lokálně prostřednictvím vzájemného kontaktu mezi buňkami, nebo se vyskytují jako vylučované proteiny schopné difundovat ke vzdálenějším cílům. Paralelní rodina receptorů ukazuje na to, že přítomnost těchto proteinů vede k iniciaci buněčné smrti nebo buněčné proliferace a diferenciaci cílové tkáně. V současnosti rodina TNF ligandů a receptorů obsahuje nejméně 9 známých párů receptor-ligand: TNF:TNF-R, LT- α :TNF-R,

LT- α / β :LT- β -R, FasL:Fas, CD40L:CD40, CD30L:CD30, CD27L:CD27, OX40L:OX40 a 4-1BBL:4-1BB. Sekvence DNA kódující tyto ligandy vykazují identitu pouze ve 25 % až 30 %, a to dokonce i v případě největší příbuznosti, ačkoliv příbuznost na úrovni sekvence aminokyselin je přibližně 50%.

Určujícím rysem této rodiny cytokinových receptorů je extracelulární doména bohatá na cystein, která byla objevena při molekulovém klonování dvou různých receptorů TNF. Tato genová rodina kóduje glykoproteiny s vlastnostmi transmembránových proteinů typu I s extracelulární vazebnou doménou vážící ligand, jednou transmembránovou doménou a cytoplazmatickým úsekem, který se podílí na aktivaci buněčných funkcí. Úsek bohatý na cystein, který je současně vazebným úsekem pro ligand, má centrální doménu z hustě spojených disulfidových můstků, která se několikrát opakuje, což závisí na konkrétním členu rodiny. Většina receptorů má čtyři domény, ačkoliv jsou i receptory se třemi doménami nebo naopak zase se šesti doménami.

Proteiny z rodiny TNF ligandů jsou charakteristické na svém N-konci krátkým úsekem hydrofilních aminokyselin, který často obsahuje několik argininových nebo lysinových zbytků, které zřejmě slouží jako sekvence k zastavení přenosu. Pak mají transmembránový úsek a extracelulární úsek proměnné délky, který odděluje vazebnou doménu pro receptor na C-konci od buněčné membrány. Tento úsek se někdy nazývá "stopka". Vazebný úsek představuje větší část proteinu a často, i když ne vždy, obsahuje glykošylační místa. Tyto geny postrádají klasickou signální sekvenci charakteristickou pro membránové proteiny typu I, spíše odpovídají membránovým proteinům typu II, které mají C-konec zasahující mimo buňku a krátký N-konec zasahující do cytoplazmy. V některých případech, jako jsou TNF a LT- α , se může objevit v průběhu časného opracování

proteinu štěpení v úseku "stopky" a ligand pak existuje především v secernované formě. Avšak většina ligandů se vyskytuje v membránové formě a zprostředkovává lokalizovaný přenos signálů.

Struktura těchto ligandů byla rozpoznána krystalografickou analýzou TNF, LT- α a CD40L. Struktura TNF a lymfotoxinu alfa (LT- α) je "sendvičová", tj. skládají se ze dvou antiparalelních β -skládaných listů s topologií tzv. "Greek key" neboli "jelly roll". Odchylka rms mezi zbytky řetězců α a β je 0,61 Å, což vede k domněnce o vysokém stupni podobnosti jejich molekulární topografie. Strukturálním rysem, který zjevně vyplývá z molekulárních studií CD40L, TNF a LT- α , je tendence těchto ligandů vytvářet oligomerní komplexy. Oligomerní struktura je vlastní vytváření vazebných míst pro receptor v místě spojení mezi sousedními podjednotkami, čímž se vytváří multivalentní ligand. Analýzou krystalové struktury se zkoumala kvarterní struktura CD40L, TNF a LT- α a ukázalo se, že CD40L, TNF a LT- α existují jako trimery. Mnoho aminokyselin konzervovaných mezi těmito ligandy se vyskytuje právě v oblasti úseků kostry struktury β -listu. Je pravděpodobné, že základní sendvičová struktura je zachována u všech těchto molekul, neboť části těchto sekvencí kostry jsou konzervovány mezi různými členy celé rodiny. Kvarterní struktura se zřejmě také udržuje, neboť konformace podjednotek pravděpodobně také zůstává podobná.

Členy rodiny TNF mohou být nejlépe charakterizovány jako hlavní přepínače v imunitním systému pro řízení přežívání buněk a také buněčné diferenciaci. V současnosti jsou známy pouze dva secernované cytokiny, a sice TNF a LT- α , na rozdíl od většiny ostatních členů rodiny TNF zakotvených v membráně. Zatímco membránové formy TNF byly dobře charakterizovány a pravděpodobně mají jedinečnou biologickou

funkci, funkcí secernovaných TNF je všeobecná signalizace "poplachu" buňkám vzdáleným od místa události, která příslušnou událost vyvolala. Sekrece TNF může znásobit událost vedoucí k dobře známým změnám ve výstelce cév a v buňkách v místě zánětu. Naproti tomu členy TNF rodiny vázané na membránu předávají signál prostřednictvím receptoru typu TNF pouze buňkám v přímém kontaktu. Tak např. pomocné T-buňky poskytují "pomoc" zprostředkovanou CD40 pouze takovým B-buňkám, se kterými se dostanou do přímého kontaktu prostřednictvím interakcí TCR. Podobná omezení na bezprostřední buněčný kontakt se týkají schopnosti indukovat buněčnou smrt u v současnosti zkoumaného systému Fas.

Schopnost indukovat programovanou buněčnou smrt je důležitou a nyní velmi zkoumanou vlastností několika členů rodiny TNF. Apoptóza zprostředkovaná Fas hraje zřejmě roli v regulaci autoreaktivních periferních lymfocytů a možná také v brzlíku (Castro et al., 1996). Současné výzkumy také poukazují na roli TNF a CD30 v přežívání T-buněk a linií velkých anaplastických lymfomových buněk (Amakawa et al., 1996, Gruss et al., 1994, Sytwu et al., 1996, Zheng et al., 1995). Již dříve jsme my i jiní autoři prokázali, že odumírání takové linie jako reakce na buněčnou signalizaci zprostředkovanou TNF, Fas nebo LTb, má vlastnosti apoptózy (Abreu-Martin et al., 1995, Browning et al., 1996).

Ligandy TNF je možné rozdělit do třech skupin na základě jejich schopnosti indukovat buněčnou smrt (viz tab. 3 v oddíle Příklady). V první skupině jsou ligandy TNF, Fas a TRAIL, které mohou účinně indukovat buněčnou smrt v mnoha liniích a jejich receptory mají většinou kanonické "smrtící" domény. Pravděpodobně ligand DR-3 (TRAMP/WSL-1) by patřil také do této kategorie. Druhou skupinu tvoří takové ligandy, které spouštějí slabší signál omezený jen na některé buněčné

typy. Do této druhé skupiny patří např. TRELL, CD30 ligand a LT α 2. Zajímavou otázkou je, jak členy této skupiny mohou spouštět mechanismus vedoucí k buněčné smrti, když nemají kanonickou "smrticí" doménu. Nepřítomnost této domény vede k domněnce, že existuje ještě jiný způsob signalizace v mechanismu buněčné smrti. Do poslední skupiny patří ty členy, které nejsou schopny přenášet žádný signál vedoucí k buněčné smrti. Ale pravděpodobně členy všech skupin mohou působit antiproliferačně na některé typy buněk jako následek indukce diferenciací, jako např. CD40 (Funakoshi et al., 1994).

Rodina TNF se dramaticky rozrostla v poslední době a obsahuje nyní 11 různých signálních drah zahrnujících regulaci imunitního systému. Expresní vzorce TRELL a TRAIL ukazují, že v této rodině existuje značná funkční variabilita, dosud nerozpoznaná. To vyniklo zejména novým objevem dvou receptorů, které ovlivňují replikační schopnost viru Rousova sarkomu a viru herpes simplex, a také významnými objevy, že TNF má antivirovou aktivitu a virus neštovic kóduje "vějíčkové" TNF receptory (Brojatsch et al., 1996, Montgomery et al., 1996, Smith 1994, Vassalli 1992). Vytvoření rozpustného TRELL a identifikace receptoru TRELL by měla poskytnout nástroj k objasnění biologické funkce tohoto zajímavého proteinu.

TNF je mediátor septického šoku a kachexie a účastní se regulace vývoje hematopoetických buněk. Zdá se, že hraje hlavní roli jako mediátor v zánětlivé reakci a v obraně proti bakteriálním, virovým a parazitárním infekcím, a navíc má zřejmě protinádorovou aktivitu. TNF se podílí také na různých autoimunitních chorobách. TNF vytvářejí různé typy buněk, např. jsou to makrofágy, fibroblasty, T-buňky a cytotoxické NK-buňky ("natural killer"). TNF se váže na dva různé

receptory, z nichž každý působí prostřednictvím odlišných specifických signálních molekul uvnitř buňky, což výsledně vede k odlišným účinkům TNF. TNF existuje jednak ve formě vázané na membránu, ale i jako volný secernovaný cytokin.

LT- α má s TNF mnoho společných aktivit, jako např. vazbu na TNF receptory, ale na rozdíl od TNF je secernován hlavně aktivovanými T-buňkami a některými β -lymfoblastoidními nádory. Heteromerní komplex LT- α a LT- β je komplex vázaný na membránu, kde se váže na LT- β receptory. Systém LT (tj. LT s receptorem LT) se podílí na vývoji periferních lymfoidních orgánů, neboť genetické narušení LT- β vede k poruchám T a B-buněk ve slezině a k nepřítomnosti lymfatických uzlin. Systém LT- β se také podílí na buněčné smrti u některých liniích adenokarcinomových buněk.

Fas-L, další člen rodiny TNF, je exprimován přednostně v aktivovaných T-buňkách. Indukuje smrt buněk nesoucích příslušný receptor, nádorových buněk a buněk infikovaných HIV, a sice mechanismem, který je znám jako programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Kromě toho je známo, že nedostatek Fas nebo Fas-L vede k lymfoproliferativním poruchám, což potvrzuje roli systému Fas v regulaci imunitní odpovědi. Fas systém se také podílí na poškození jater v důsledku chronické infekce virové hepatitidy a na autoimunitní odpovědi u pacientů infikovaných HIV. Systém Fas se také účastní destrukce T-buněk u pacientů infikovaných HIV.

TRAIL, další člen této rodiny, se zřejmě také podílí na smrti mnoha různých transformovaných buněčných linií různorodého původu.

CD40-L, další člen rodiny TNF, je exprimován na povrchu T buněk a indukuje regulaci B buněk nesoucích CD40. Kromě toho je známo, že změny v genu pro CD40-L jsou příčinou

nemoci známé jako syndrom hyper-IgM spojený s chromozómem X. Systém CD40 je také spojen s mnoha různými autoimunitními chorobami a CD40-L má také antivirové vlastnosti. Ačkoliv se systém CD40 podílí také na záchraně apoptických B buněk, u jiných buněk než buněk imunitního systému indukuje apoptózu. Mnohé další lymfocytární členy rodiny TNF se podílejí na kostimulaci.

Obecně lze shrnout, že členy rodiny TNF hrají základní regulační roli v řízení imunitního systému a v aktivaci akutního obranného systému hostitele. Vzhledem k současnému pokroku v ovlivňování členů rodiny TNF s cílem terapeutického prospěchu je pravděpodobné, že členy této rodiny poskytnou jedinečný prostředek kontroly nemocí. Některé ligandy rodiny TNF mohou přímo indukovat apoptickou smrt mnohých transformovaných buněk, např. LT, TNF, ligand Fas a TRAIL (Nagata 1997). Fas a zřejmě i TNF a aktivace receptoru CD30 mohou indukovat buněčnou smrt netransformovaných lymfocytů, což může mít důležitou imunoregulační funkci (Amakawa et al., 1996, Nagata 1997, Sytwu et al., 1996, Zheng et al., 1995). Obecně je známo, že odumírání se spustí po agregaci "smrticích" domén, které jsou na cytoplazmatické straně receptorů TNF. Tyto "smrticí" domény organizují uspořádání různých složek signální transdukce, což nakonec vede k aktivaci celé kaskády (Nagata 1997). Některé receptory postrádají kanonické "smrticí" domény, např. receptor LTb a CD30 (Browning et al. 1996, Lee et al., 1996) a přesto mohou indukovat buněčnou smrt, i když podstatně slaběji. Tyto receptory pravděpodobně fungují primárně tak, že indukují buněčnou diferenciaci a smrt je aberantním důsledkem u některých transformovaných buněčných linií, ačkoliv celý obrázek je dosud nejasný, neboť na základě studie s myši "CD30 null" se předpokládá smrticí role v negativní selekci

v brzlíku (Amakawa et al., 1996). Naproti tomu, přenos signálů jinými drahami, jako např. právě prostřednictvím CD40, je vyžadován pro udržování a přežívání buněk. Z výše uvedeného vyplývá tedy potřeba charakterizovat další členy rodiny TNF a poskytnout tak další prostředky ke kontrole nemocí a ovlivňování imunitního systému.

Popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká polypeptidu, a sice ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru, zvaného TRELL, a tento vynález řeší řadu problémů a omezení a eliminuje nevýhody dosavadních řešení v oboru známých. Původce objevil nový člen rodiny TNF cytokinů a určil sekvenci aminokyselin jak myšího tak i lidského proteinu, včetně příslušných sekvencí DNA kódujících tyto proteiny. Vynález je možné využít pro identifikaci přípravků pro diagnózu a léčení mnohých nemocí a stavů, což je dále podrobněji popsáno, a také k získání dalších informací o imunitním systému, a pro vlastní ovlivňování imunitního systému a imunitních procesů. Kromě toho se předkládaný vynález také týká indukce buněčné smrti při karcinomu.

Další vlastnosti a výhody předkládaného vynálezu budou popsány v následujícím popisu, přitom částečně z popisu vyplynou a částečně je bude možno rozpoznat při využití vynálezu. Cíl vynálezu a jeho výhody lze dosáhnout pomocí přípravků a způsobů, které jsou zvláště zdůrazněny v popisu a v nárocích, a také v průvodních obrázcích.

V souladu s cílem vynálezu, aby bylo dosaženo výhod vynálezu, jak je v popisu a příkladech provedení vynálezu uvedeno, vynález se týká sekvence DNA kódující TRELL. Nukleotidová sekvence myšího TRELL (mTRELL) je zde uvedena

jako sekvence s identifikačním číslem 1 (id. č. 1) a sekvence lidského TRELL (hTRELL) je zde uvedena jako sekvence id. č. 3. Vynález se specificky týká sekvence DNA, která kóduje TRELL, který má sekvenci aminokyselin uvedenou zde jako sekvenci id. č. 2 (mTRELL) nebo 4 (hTRELL). Další provedení vynálezu se týká sekvence, která má alespoň 50% homologii se sekvencí DNA kódující vazebnou doménu pro receptor na 5'-konci TRELL, a přitom hybridizuje se sekvencí podle vynálezu nebo jejím fragmentem, a která kóduje TRELL, který má sekvenci uvedenou zde jako sekvenci id. č. 4 nebo id. č. 2.

Některá provedení vynálezu se týkají sekvence DNA kódující TRELL, kde sekvence je operativně spojena se sekvencí, která řídí expresi. Pro použití ve vynálezu je vhodná jakákoliv sekvence pro řízení exprese a vhodná sekvence může být odborníkem snadno vybrána.

Předkládaný vynález se dále týká rekombinantní DNA, která obsahuje sekvenci DNA kódující TRELL nebo její fragment, a také hostitelů, kteří mají trvale integrovanou sekvenci TRELL v genomu nebo v podobě episomálního elementu. Podle vynálezu je možné užít jakéhokoli vhodného hostitele, který může být vybrán odborníkem bez vynaložení nadměrného úsilí.

Další provedení předkládaného vynálezu se týká způsobu přípravy v podstatě čistého TRELL, který obsahuj kroky, kdy se kultivuje transformovaný hostitel a dále se týká TRELL prostého všech živočišných proteinů, které jsou s ním normálně asociovány.

Vynález zahrnuje TRELL, který má aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako sekvenci id. č. 4 nebo sekvenci id. č. 2, nebo jeho fragmenty či homology. V různých provedeních vynálezu sekvence aminokyselin nebo sekvence DNA

TRELL mohou obsahovat konzervativní inserce, delece a substituce, jak bude ukázáno dále nebo mohou obsahovat fragmenty zmíněných sekvencí.

Jiné provedení předkládaného vynálezu se týká rozpustného konstruktu TRELL, který je možné použít pro přímé spuštění farmakologické události zprostředkované TRELL. Taková událost může mít terapeutický účinek v léčení rakoviny nebo v manipulaci s imunitním systémem pro léčení imunologických onemocnění. Rozpustné formy TRELL mohou být metodami genového inženýrství upraveny tak, aby obsahovaly snadno rozpoznatelnou značku, a tím umožnily identifikaci receptorů TRELL.

Další provedení předkládaného vynálezu se týká použití TRELL pro genovou terapii.

Farmaceutický přípravek podle předkládaného vynálezu může volitelně obsahovat také farmaceuticky přijatelný nosič, adjuvans, plnidlo nebo jiné farmaceutické přípravky, a může být podáván jakýmkoliv způsobem známým v oboru.

Jak předcházející stručný přehled tak i následující podrobný popis vynálezu je třeba považovat za vysvětlení vynálezu a za příklady, které slouží k podrobnějšímu vysvětlení předkládaného vynálezu.

Taktéž obrázky slouží k lepšímu porozumění vynálezu a tvoří součást popisu vynálezu, jsou určeny k tomu, aby ilustrovaly některá provedení vynálezu a společně s popisem sloužily k vysvětlení principu předkládaného vynálezu.

Popis obrázků

Obr. 1 ukazuje srovnávací analýzu aminokyselinových sekvencí lidského a myšího TRELL.

26.02.99

Obr. 2A a 2B ukazují srovnávací analýzu aminokyselinových sekvencí lidských členů rodiny TNF.

Obr. 3 ukazuje výsledek "northernové" analýzy exprese mRNA TRELL v různých liniích myších buněk a tkáních. Dráhy jsou v duplikátech a obsahují RNA z 1) peritoneálních makrofágů indukovaných thioglykolátem 2) kostní dřeně 3) sleziny a 4) jater.

Obr. 4 je výsledek "northernové" analýzy exprese mRNA TRELL v různých lidských tkáních.

Obr. 5. je výsledek SDS-PAGE elektroforézy rekombinantního TNF, LT- α a TRELL v redukujících a neredukujících podmínkách.

Obr. 6 ukazuje, že TRELL je cytotoxický pro buňky lidského adenokarcinomu HT29.

A. Schopnost TNF, TRELL, LT α / β a anti-Fas blokovat růst buněk linie HT29 v přítomnosti lidského interferonu-g. Buňky byly kultivovány 4 dny v přítomnosti různých činidel a růst byl hodnocen pomocí barvení MTT.

B. Morfologie buněk, u kterých probíhá proces buněčné smrti. Buňky byly předpěstovány 2 dny a pak po 24 hodin podrobeny působení 80 U/ml interferonu-g, a to buďto bez dalšího ošetření (A) nebo po fixaci etanolem 100ng/ml (B). Horní panely ukazují buňky ve fázovém kontrastním mikroskopu (zvětšení 400x), dolní panely buňky ošetřené barvivem Hoechst 1 μ g/ml pro zvýraznění jader. Šipky ukazují typické buňky s kondenzovaným jádrem, které je charakteristické pro apoptózu.

Podrobný popis vynálezu

Popis se bude týkat především podrobností výhodného provedení předkládaného vynálezu. Předkládaný vynález se týká sekvencí DNA, které kódují lidský nebo myší TREL, jeho fragmenty nebo homology, a dále se týká exprese těchto DNA v hostitelích těmito DNA transformovanými. Kromě toho se vynález týká jak lidské tak myší aminokyselinové sekvence TREL, nebo jeho fragmentů či homologů, a dále se týká farmaceutického přípravku obsahujícího tyto sekvence nebo z těchto sekvencí odvozeného.

A. Definice

Termín "homologní" v tomto textu popisuje podobnost mezi sekvencemi srovnávaných molekul. Pokud je jistá pozice v obou srovnávaných sekvencích obsazena shodnou monomerní jednotkou, tj. bází nebo aminokyselinou, např. jeli stejná pozice v každé ze dvou molekul DNA obsazena adeninem, pak tyto molekuly jsou homologní v dané pozici.

Homologie mezi dvěma sekvencemi vyjádřená v procentech je funkce počtu shodných čili homologních pozic, které jsou sdíleny oběma sekvencemi, dělená počtem všech srovnávaných pozic a vynásobená 100. Tak např. jestliže u dvou sekvencí je 6 pozic z 10 shodných neboli homologních, pak tyto sekvence mají 60% homologii. Nebo např. dvě sekvence ATGCGC a TATGCGC sdílejí 50% homologii. Obecně se provádí takové srovnání, kdy sekvence jsou k sobě navzájem "přiloženy" tak, aby homologie byla maximální.

Termíny "purifikovaný preparát" nebo "v podstatě čistý preparát" polypeptidu slouží k označení polypeptidu, který byl oddělen od ostatních proteinů, lipidů a nukleových kyselin, se kterými se společně přirozeně vyskytuje. Výhodně

je polypeptid oddělen také od jiných látek jako např. protilátek nebo matrix, které byly použity pro čištění.

Termín "transformovaný hostitel" zahrnuje jakéhokoliv hostitele se sekvencí, tj. sekvencí TRELL, trvale integrovanou do genomu, nebo hostitele, který má sekvenci, tj. sekvenci TRELL, kódovanou episomálními elementy.

Termín "ošetření" se zde užívá pro jakékoliv terapeutické ošetření, např. podávání terapeutického agens nebo látky, např. léku.

Termín "v podstatě čistá nukleová kyselina", např. v podstatě čistá DNA, znamená nukleovou kyselinu, která 1) není bezprostředně spojena s jednou nebo dvěma sekvencemi (jedna na 5'-konci a jedna na 3'-konci), např. kódujícími sekvencemi, se kterými sousedí v přirozeně se vyskytujícím genomu příslušného organismu, ze kterého je nukleová kyselina připravena, nebo 2) je v podstatě bez sekvencí nukleových kyselin, které se vyskytují v organismu, ze kterého je uvedena nukleová kyselina připravena, nebo platí současně obě možnosti. Tento termín zahrnuje např. rekombinantní DNA vloženou do vektoru, např. do autonomně se replikujícího plazmidu nebo viru, nebo do genomové DNA prokaryotického nebo eukaryotického organismu, nebo která existuje jako samostatná molekula, např. cDNA nebo fragment genomové DNA vytvořený pomocí PCR nebo působením restričních endonukleáz, nezávislá na jiných sekvencích DNA. V podstatě čistá DNA také zahrnuje rekombinantní DNA, která je součástí hybridního genu kódujícího TRELL.

Termíny "peptidy", "proteiny" a "polypeptidy" popisují totéž a jsou užívány navzájem zaměnitelným způsobem.

Termín "biologicky aktivní" je používán ve smyslu mít aktivitu, buďto *in vitro* nebo *in vivo*, která se přímo nebo nepřímo projevuje. Tak např. biologicky aktivní fragment

TRELL může mít např. 70% homologii aminokyselinové sekvence s aktivním místem TRELL, výhodněji alespoň 80% homologii a nejvýhodněji alespoň 90% homologii. Identita nebo homologie vzhledem k TRELL je definována jako procenta aminokyselinových zbytků v příslušné sekvenci, které jsou identické s aminokyselinovými zbytky sekvencí TRELL uvedenými zde jako sekvence id. č. 2 a 4.

Provedení předkládaného vynálezu vyžaduje, pokud není uvedeno jinak, použití technik obvyklých v buněčné biologii, buněčných a tkáňových kulturách, molekulární biologii, transgenní biologii, mikrobiologii, techniku rekombinantní DNA a imunologické metody, které jsou v oboru známé. Takové techniky jsou popsány v příslušné odborné literatuře.

B. Sekvence DNA podle vynálezu

Jedním aspektem předkládaného vynálezu je v podstatě čistá (nebo rekombinantní) nukleová kyselina, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid TRELL, jako je např. sekvence uvedená zde jako sekvence id. č. 1 nebo 3 a/nebo ekvivalenty takových nukleových kyselin. Termín "nukleová kyselina" zahrnuje také fragmenty nebo ekvivalenty, jako jsou např. sekvence kódující funkčně ekvivalentní polypeptidy. Ekvivalentní nukleotidové sekvence mohou obsahovat sekvence, které se liší jednou nebo několika nukleotidovými substitucemi, adicemi nebi delecemi, jako jsou např. alelické varianty, mutace atd., a mohou také obsahovat nukleotidové sekvence, které se liší od sekvencí kódujících TRELL uvedených zde jako sekvence id. č. 1 nebo 3, díky degeneraci genetického kódu. Původce sekvencoval lidskou DNA velikosti 1936 bp, která obsahuje otevřený čtecí rámec kódující polypeptid TRELL, který obsahuje 248 aminokyselin, jak je zde uvedeno v sekvenci id. č. 4.

Ve vynálezu jsou popsány jak lidské tak i myší sekvence, přičemž popis vynálezu se obecně týká lidských sekvencí, ale odborníkovi je zřejmé, že totéž se obdobně týká myších sekvencí. Pozoruhodným rysem TRELL je rozsah shody sekvence (konzervativnost sekvence) domény vážící receptor mezi člověkem a myší. Pouze ligand Fas se blíží obdobné míře. Jak myší tak lidský protein TRELL mají všechny charakteristické vlastnosti členů rodiny TNF, tj. organizaci mebránového proteinu typu II a konzervované sekvenční motivy důležité pro prostorové uspořádání proteinu do struktury antiparalelního β -listu charakteristické pro TNF.

Nukleotidová sekvence mTRELL je v této přihlášce uvedena jako sekvence id. č. 1, sekvence aminokyselin mTRELL je sekvence id. č. 2. Sekvence DNA a sekvence aminokyselin hTRELL jsou zde uvedeny jako sekvence id. č. 3 a 4.

Sekvence podle předkládaného vynálezu se mohou použít pro přípravu série DNA sond, které jsou vhodné pro testování různých sad přirozených nebo syntetických DNA, zda tyto sekvence kódují TRELL nebo jeho fragmenty nebo deriváty. Odborníkovi je zřejmé, že termín TRELL se zde užívá v takovém smyslu, že zahrnuje i biologicky aktivní deriváty, fragmenty a homology TRELL.

Sekvence kódující TRELL podle předkládaného vynálezu se může využít pro expresi peptidu TRELL v různých prokaryotických nebo eukaryotických hostitelích transformovaných takovými sekvencemi. Peptidy TRELL se mohou použít jako protirakovinná nebo imunoregulační agens. Obecně to znamená, že jedním z kroků aplikace je kultivovat hostitele transformované molekulou DNA obsahující kódující sekvenci TRELL, operativně spojenou se sekvencí řídící expresi.

Sekvence DNA a rekombinantní molekuly DNA podle předkládaného vynálezu mohou být exprimovány pomocí širokého spektra kombinací hostitel/vektor. Tak např. vhodné vektory mohou obsahovat segmenty chromosomových, jiných než chromosomových, nebo syntetických sekvencí DNA. Expresní vektory podle vynálezu obsahují alespoň jednu sekvenci pro řízení exprese, která je operativně spojena se sekvencí kódující TREL vloženu do vektoru, aby bylo možné regulovat či řídit expresi sekvence DNA.

V rámci každého expresního vektoru se mohou vybrat různá místa pro vložení sekvence TREL podle předkládaného vynálezu. Místa jsou většinou navržena podle restričních endonukleáz, které v příslušném místě štěpí, a tato místa i endonukleázy jsou odborníkovi dobře známy. Odborníkovi je také zřejmé, že vektor pro použití podle předkládaného vynálezu nemusí obsahovat místa pro restriční endonukleázy pro vložení požadovaného fragmentu DNA, místo toho může být fragment klonován do vektoru alternativním způsobem. Výběr expresního vektoru, a zvláště míst vhodných pro vložení vybraného fragmentu DNA a jeho spojení se sekvencí řídící exprese, závisí na mnoha faktorech. K těmto faktorům patří např. velikost proteinu, který má být exprimován, citlivost tohoto proteinu k proteolytické degradaci enzymy hostitelské buňky, počet míst pro příslušný restriční enzym, kontaminace nebo vazba exprimovaného proteinu proteiny hostitelské buňky, které jsou těžko odstranitelné v průběhu purifikace apod. Další faktory, které je třeba vzít v úvahu, jsou expresní charakteristiky jako je např. poloha startovacího a ukončovacího kodonu vzhledem k sekvencím vektoru, a další faktory, které jsou odborníkovi zřejmé. Výběr vektoru a vhodných míst pro vložení sekvence DNA podle předkládaného vynálezu je tedy výsledkem zvážení všech těchto faktorů,

přičemž ne všechna řešení jsou stejně účinná pro požadované aplikace. Ale pro odborníka je analýza všech těchto faktorů rutinní záležitostí a výběr vhodného systému pak závisí především na konkrétním použití.

Odborník je snadno schopen vhodně modifikovat sekvence řídící exprese tak, aby se získala vyšší úroveň proteinové exprese, např. substitucí kodonů nebo výběrem kodonů určitých zvláštních aminokyselin, které jsou přednostně užívány konkrétním organismem, s cílem zmenšit proteolýzu nebo změnit vzorec glykosylace. Podobně mohou být nahrazeny cysteinové zbytky jinými aminokyselinami, aby se usnadnila produkce nebo uspořádání proteinu, nebo aby se předešlo problémům se stabilitou.

Ne všechny kombinace hostitele a expresního vektoru fungují se stejnou účinností co se týče exprese sekvence DNA podle předkládaného vynálezu. Avšak výběr konkrétní vhodné kombinace hostitele a expresního vektoru může být odborníkem proveden. K faktorům, které je třeba vzít v úvahu, patří např. kompatibilita hostitele a vektoru, toxicita proteinů kódovaných sekvencemi DNA vektoru pro hostitele, snadnost izolace požadovaného proteinu, expresní charakteristiky sekvencí DNA a sekvencí řídících exprese s nimi operativně spojených, biologická bezpečnost, potřeba energie na uspořádání struktury proteinu, forma proteinu a případně poexpresní modifikace požadovaného proteinu.

TRELL a jeho homology, produkované hostiteli transformovanými sekvencemi DNA podle předkládaného vynálezu, stejně jako nativní TRELL purifikovaný způsobem podle vynálezu, nebo vytvořený na základě aminokyselinové sekvence podle vynálezu, jsou užitečné pro řadu aplikací protinádorových a imunoregulačních. Jsou také užitečné v terapii a způsobech týkajících se i jiných nemocí.

Předkládaný vynález se také týká použití sekvencí DNA podle vynálezu pro expresi TRELL ve zvláštních podmínkách, tj. při genové terapii. TRELL může být exprimován v nádorových buňkách, kde by exprese byla řízena promotory vhodnými pro tento účel. Taková exprese může posílit protinádorovou imunitní odpověď nebo přímo ovlivnit přežívání nádoru. Takové cytokiny jako TRELL mohou také ovlivnit přežívání orgánových štěpů tím, že změní lokální imunitní odpověď. V takovém případě by byl sám štěp nebo buňky, které ho obklopují, ovlivněn genem TRELL upraveným metodami genového inženýrství.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je použití izolované nukleové kyseliny kódující TRELL pro tzv. "antisense" terapii. Termín "antisense" terapie se týká podání nebo *in situ* vytvoření oligonukleotidů nebo jejich derivátů, které specificky hybridizují (váží se) v normálních buněčných podmínkách s buněčnou mRNA a/nebo DNA kódující TRELL, a tak inhibují expresi kódovaného proteinu tím, že inhibují transkripci a/nebo translaci. Zmíněná vazba může být konvenční komplementarita párů bazí nebo např. v případě vazby na duplexy DNA, vazba prostřednictvím specifických interakcí v hlavním (velkém) zářezu dvoušroubovicové DNA. Obecně se "antisense" terapie týká celé řady technik v oboru užívaných a patří sem v podstatě jakákoliv terapie založená na specifické vazbě oligonukleotidové sekvence.

Antisense konstrukt podle předkládaného vynálezu je např. expresní plazmid, který při transkripci v buňce, produkuje RNA, která je komplementární (tj. má opačnou, tedy "antisense" orientaci) k buněčné mRNA kódující TRELL. Alternativně může být "antisense" konstrukt také oligonukleotidová sonda připravená *ex vivo*. Takové oligonukleotidové sondy jsou výhodně modifikované

oligonukleotidy, které jsou rezistentní k endogenním nukleázám a jsou proto stabilní *in vivo*. Příkladem takových molekul nukleových kyselin vhodných jako "antisense" oligonukleotidy jsou fosfoamidátové, fosfothioátové a metylfosfonátové analogy DNA (viz patentové přihlášky USA č. 5 176 996, 5 264 564 a 5 256 775). Kromě toho obecný postup jak konstruovat oligomery vhodné pro "antisense" terapii byly přehledně publikovány např. Van Der Krol et al., 1988, *Biotechniques* 6: 958-976 a Stein et al., 1988, *Cancer Res.* 48: 2659-2668, na což se tímto odkazujeme.

C. TRELL a jeho aminokyselinová sekvence

Protein TRELL, tj. protein příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru (TNF), podle předkládaného vynálezu patří do rodiny proteinů TNF. Tento protein sám, nebo jeho fragmenty či homology, má široké možnosti terapeutického a diagnostického použití.

TRELL se vyskytuje v mnoha tkáních, ale vzorec výskytu je zpravidla jedinečný pro členy rodiny TNF. Jelikož se členy rodiny TNF podílejí na regulaci buněčné smrti a přežívání, a na buněčné diferenciaci, je i možné, že TRELL se také podílí na přežívání buněk, diferenciaci a reparaci buněk v různých tkáních.

I když dosud není známa přesná trojrozměrná struktura TRELL, na základě příslušnosti k rodině TNF lze předpovědět, že TRELL sdílí určité strukturní rysy s ostatními členy této rodiny. V přihlášce jsou popsány jak myší tak i lidský TRELL. myší TRELL, jak lze dedukovat z existující sekvence cDNA, obsahuje úsek alespoň 21 hydrofóbních aminokyselin, který pravděpodobně u membránových proteinů typu II působí jako doména ukotvující protein v membráně. Aminokyselinová sekvence mTRELL je zde uvedena jako sekvence id. č. 2.

Lidský TRELL obsahuje na N-konci hydrofilní cytoplazmatickou doménu, hydrofóbní zhruba v rozsahu 27 aminokyselin, transmembránovou doménu typu II a extracelulární doménu z 204 aminokyselin. Aminokyselinová sekvence hTRELL je zde uvedena jako sekvence id. č. 4.

Obr. 1 představuje srovnání aminokyselinových sekvencí lidského a myšího TRELL.

Zatímco 52 aminokyselin N-koncového úseku je možné předpovědět na základě otevřeného čtecího rámce z klonu cDNA, přesná poloha počátečního methioninu nemohla být určena. Met-36 (methionin v poloze 36) poskytuje přiměřenou konsenzuální Kozakovu sekvenci, takže je to pravděpodobně vhodný počáteční kodon. Srovnání sekvence TRELL s ostatními členy lidské rodiny TNF ukazuje značnou strukturní podobnost. Tak např. jak je patrné z obr. 2A a 2B, všechny proteiny připomínají membránové proteiny typu II a sdílejí několik úseků konzervovaných sekvencí extracelulární domény. Na obrázcích úseky s čárkami nad sekvencemi ukazují ty sekvence TNF a LT α , které vytvářejí strukturu β -listu v dané molekule. Předpokládaná místa N-glykosylace jsou podtržena. Hvězdičky označují cysteinové zbytky vytvářející disulfidové vazby v molekule TNF. Konzervativní domény se pravděpodobně podílejí na interakcích podjednotek a na vytváření struktury listu.

Prohledávání databáze EST klonů vedlo k objevení lidského klonu o velikosti 345 bp, který je silně homologní s myším TRELL. Lidská aminokyselinová sekvence TRELL je zde uvedena jako sekvence id. č. 4. Otevřené čtecí rámce zmíněného EST klonu neobsahují sekvenční motivy, které by umožnily charakterizovat sekvenci jakožto člena rodiny TNF nebo příslušného ligandu (tj. motivy, které užily Willey et

al. pro identifikaci EST klonu pro TRAIL v dostupné databázi).

Nový polypeptid podle předkládaného vynálezu specificky reaguje s receptorem, který dosud nebyl identifikován. Avšak peptidy a způsoby podle předkládaného vynálezu umožňují identifikovat receptory, které specificky reagují s TREL nebo jeho fragmenty.

Určitá provedení podle předkládaného vynálezu zahrnují peptidy odvozené z TREL, které mají schopnost vázat se na receptory pro TREL. Fragmenty TREL je možné připravit různými způsoby, např. rekombinantní technologií, pomocí PCR, proteolytickým štěpením nebo chemickou syntézou. Vnitřní nebo koncové fragmenty polypeptidu se mohou připravit odstraněním jednoho nebo několika nukleotidů z jednoho nebo z obou konců nukleové kyseliny, která kóduje polypeptid. Fragmenty polypeptidu lze také připravit expresí mutované DNA. Pomocí štěpení endonukleázou, která "ukusuje konce" DNA, je možné připravit celou řadu fragmentů. DNA, která kóduje fragmenty proteinu, se může také připravit náhodným "rozstříháním" řetězců DNA, nebo restrikcčním štěpením anebo kombinací metod výše uvedených.

Polypeptidové fragmenty se mohou také chemicky syntetizovat pomocí konvenční techniky známé jako syntéza na pevné fázi užívající f-moc nebo t-boc (Merrifield). Tak např. ~~peptidy a sekvence DNA podle předkládaného vynálezu je~~ možné v podstatě libovolně rozdělit na fragmenty požadované délky, které se nepřekrývají, nebo na překrývající se fragmenty požadované délky. Příslušné metody jsou popsány v následujícím textu.

D. Příprava rozpustného TRELL

Rozpustné formy ligandu jsou často velmi účinné v přenosu signálu a mohou tudíž být podávány jako lék, který napodobuje přirozenou membránovou formu. Je možné, že TRELL je přirozeně secernován jako rozpustný cytokin, ale pokud tomu tak není, je možné uzpůsobit gen metodami genového inženýrství tak, aby se zesílila sekrece. Pro přípravu rozpustné secernované formy TRELL by bylo třeba odstranit na úrovni DNA N-koncový transmembránový úsek a některé úseky "stonku", a nahradit je vedoucí sekvencí typu I nebo typu II, která umožní účinné proteolytické štěpení v příslušném hostitelském systému. Odborník je schopen optimalizovat vazebné vlastnosti k receptoru a sekreční účinnost tím, že lze měnit rozsah "stonkových" úseků ponechaných v expresním konstruktu. Tak např. lze připravit odštěpováním z N-konce konstrukty obsahující všechny možné délky "stonku", takže vzniknou proteiny, které budou začínat aminokyselinou 81 až 139. Tímto typem analýzy lze stanovit optimální délku sekvence "stonku".

E. Příprava protilátek reaktivních s TRELL

Předkládaný vynález se také týká protilátek specificky reagujících s TRELL nebo jeho receptorem. Antiséra anti-protein/anti-peptid nebo monoklonální protilátky mohou být připraveny standardními způsoby (viz např. Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor press, 1988). Savci jako např. myš, křeček nebo králík, se mohou imunizovat imunogenní formou peptidu. Způsoby, jak učinit protein nebo peptid imunogenním tím, že se např. konjuguje s nosičem, nebo jiné způsoby, jsou v oboru známy.

Imunogenní část TRELL nebo jeho receptoru může být podána společně s adjuvans. Postup imunizace je možné

monitorovat pomocí detekce titru protilátek v plazmě nebo séru. Standardní test ELISA nebo jiné imunotesty se mohou použít s imunogenem coby antigenem k ohodnocení hladin protilátek.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou protilátky imunospecifické nebo antigenní determinanty TRELL nebo jeho receptoru, tj. antigení determinanty polypeptidu sekvence id. č. 2 nebo 4, nebo blízce příbuzný lidský nebo savčí, jiný než lidský, homolog (s homologií 70, 80 nebo 90 %, nejvýhodněji s homologií alespoň 95 %). V dalším výhodném provedení předkládaného vynálezu protilátky anti-TRELL nebo anti-receptor TRELL v podstatě křížově nereagují (tj. reagují pouze specificky) s proteinem, který je např. méně než z 80 % homologní se sekvencí id. č. 2 nebo i. č. 4, výhodně méně než z 90 % a nejvýhodněji méně než z 95 % homologní se sekvencí id. č. 2 nebo id. č. 4. Tím, že "v podstatě křížově nereagují" se míní to, že protilátka má vazebnou afinitu k nehomolognímu proteinu menší než 10 % vazebné afinity k proteinu sekvence id. č. 2 nebo id. č. 4.

Termín "protilátka" se v tomto textu užívá tak, že zahrnuje i fragmenty protilátky, které také specificky reagují s TRELL nebo receptorem TRELL. Protilátky lze fragmentovat pomocí obvyklých způsobů, které jsou v oboru známy, a možnosti využití fragmentů lze pak testovat stejnými způsoby jak bylo popsáno pro celé protilátky. Tak např. fragment $F(ab')_2$ je možné připravit působením pepsinu. Výsledný fragment se pak může ošetřit tak, aby se redukovaly disulfidové můstky, čímž vznikne fragment Fab'. Protilátky podle předkládaného vynálezu jsou dále tvořeny biospecifickými a chimérickými molekulami, které mají aktivitu namířenou proti TRELL nebo proti receptoru TRELL. Takže pro blokování TRELL nebo jeho receptoru je možné využít

jak monoklonálních tak polyklonálních protilátek namířených proti TRELL a receptoru TRELL, a také příslušné fragmenty jako např. Fab' nebo F(ab')₂.

Různé formy protilátek je možné připravit standardními technikami rekombinantní DNA (Winter a Milstein, Nature 349: 293-299, 1991). Např. je možné konstruovat takové chimérické protilátky, kde vazebná doména pro antigen z protilátky zvířete je spojena s lidskou konstantní doménou (Cabilly et al., patentová přihláška USA č. 4 816 567). Chimérické protilátky redukuje pozorovanou imunitní odpověď vyvolanou zvířecím protilátkami, když jsou použity v klinických aplikacích pro lidské pacienty.

Kromě toho se mohou syntetizovat rekombinantní "humanizované" protilátky, rozpoznávající TRELL nebo jeho receptor. Humanizované protilátky jsou chimérické protilátky, které obsahují většinou sekvence lidského IgG, do nichž byly vloženy sekvence zodpovědné za specifickou vazbu k antigenu. Zvířata se imunizují požadovaným antigenem, pak se izoluje příslušná protilátka a odstraní se z ní část variabilního úseku zodpovědná za specifickou vazbu antigenu. Úsek vážící antigen ze zvířete se pak klonuje do vhodného místa genu lidské protilátky, ze kterého byl odstraněn úsek vážící antigen. Humanizované protilátky minimalizují použití heterologních (tj. mezidruhových) sekvencí v lidských protilátkách, které pak s menší pravděpodobností vyvolají imunitní odpověď u ošetřovaného pacienta.

Různé třídy rekombinantních protilátek se mohou vytvářet také tak, že se připraví chimérické nebo humanizované protilátky obsahující variabilní domény a lidské konstantní domény (CH1, CH2 a CH3) izolované z různých tříd imunoglobulinů. Tak např. se mohou připravit rekombinantním způsobem protilátky se zvýšenou valencí vazebných míst pro

antigen, a to tak, že se klonuje vazebné místo pro antigen do vektoru nesoucího konstantní úsek řetězce lidské protilátky (Arulandam et al., J. Exp. Med. 177: 1439-1450, 1993). Kromě toho lze použít standardní techniky rekombinantní DNA pro změnu vazebné afinity rekombinantních protilátek s jejich antigeny tím, že se změní zbytky aminokyselin v blízkosti vazebného místa pro antigen. Vazebná afinita pro antigen u humanizované protilátky se může zvýšit mutagenezí založenou na molekulovém modelování (Quenn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-33, 1989).

F. Vytváření analogů a příprava změněných sekvencí DNA a peptidů

Analogy TRELL se mohou lišit od přirozeně se vyskytujícího TRELL v sekvenci aminokyselin, nebo jinak než v sekvenci aminokyselin, nebo oběma způsoby. Jiné modifikace než modifikace sekvence jsou jak *in vitro* tak *in vivo* chemické derivatizace TRELL. K těmto nesequenčním modifikacím patří (nejen) změny v acetylaci, metylaci, fosforylaci, karboxylaci nebo glykosylaci.

K výhodným analogům TRELL patří TRELL nebo jeho biologicky aktivní fragmenty, jejichž sekvence se liší od sekvencí uvedených zde jako sekvence id. č. 2 a id. č. 4

jednou nebo několika konzervativními substitucemi aminokyselin nebo jednou nebo několika substitucemi, delecemi nebo inzercemi aminokyselin, které sice nejsou konzervativní, ale nenarušují aktivitu TRELL. Ke konzervativním substitucím typicky patří substituce jedné aminokyseliny jinou aminokyselinou s podobnými vlastnostmi, např. substituce v rámci následujících skupin: valin - glycin, glycin - alanin, valin - isoleucin - leucin, kyselina aspartová -

kyselina glutamová, asparagin - glutamin, serin - threonin, lysin - arginin a fenylalanin - tyrosin.

Konzervativní záměny aminokyselin jsou přehledně uvedeny v tab. 1.

Tab. 1

Konzervativní záměny aminokyselin

Aminokyselinu	Kód	Nahrad' jakoukoliv z následujících
Alanin	A	D-Ala, Gly, Beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginin	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagin	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Kyselina aspartová	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cystein	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamin	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp,
Kyselina glutamová	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glycin	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, -Ala, Asp
Isoleucin	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucin	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met

Tabl. pokračování

Aminokyselinu	Kód	Nahrad' jakoukoliv z následujících
Lysin	K	D-Lys, Arg, D-Arg, Homo-Arg, D-Homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Methionin	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenylalanin	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His Trp, D-Trp, Trans-3,4 nebo 5-fenylprolin, cis-3,4 nebo 5-fenylprolin
Prolin	P	D-Pro, L-1-thioazolidin-4-karboxylová kyselina, D- nebo L-1-oxazolidin-4- karboxylová kyselina
Serin	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Threonin	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tyrosin	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valin	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Vhodnými způsoby mutagenese je mutagenese pomocí PCR a saturační mutagenese, které budou popsány v následující části. Také je možné vytvořit knihovnu variant náhodných sekvencí aminokyselin pomocí syntézy sady degenerovaných oligonukleotidových sekvencí.

Mutagenese pomocí PCR

Při mutagenезi pomocí PCR se využívá relativně malá přesnost Taq polymerázy k zavedení náhodných mutací do klonovaného fragmentu DNA (Leung et al., Technique 1: 11-15, 1989). Je to velmi účinná a přitom velmi rychlá metoda pro vnesení náhodných mutací. Úsek DNA, který má být mutován, se amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v podmínkách, které snižují přesnost Taq polymerázy, tj. jestliže je poměr dGTP/dATP přibližně roven 5 a přidá se Mn^{2+} do reakční směsi pro PCR. Celá sada amplifikovaných fragmentů se pak klonuje do vhodných vektorů a vytvoří se tak knihovna náhodných mutantů.

Saturační mutagenese

Saturační mutagenese dovoluje rychlé vnesení mutací typu substituce jedné baze do klonovaného fragmentu DNA (Mayers et al., Science 229:242, 1985). Tato technika zahrnuje generaci mutací, tj. chemické ošetření nebo ozáření jednořetězcové DNA *in vitro*, a pak syntézu komplementárního řetězce DNA. Frekvence mutací může být ovlivněna silou působícího účinku a v podstatě lze dosáhnout substituce všech možných bazí. Jelikož celý tento proces nezahrnuje žádnou genetickou selekci mutovaných fragmentů, získají se tak fragmenty jak s neutrálními substitucemi, tak náhodně mutované fragmenty DNA, ze kterých se mohou připravit proteiny se změněnou funkcí. Distribuce bodových mutací není přitom nijak směřována na konzervativní sekvenční prvky.

Mutagenese pomocí degenerovaných oligonukleotidů

Knihovnu homologů je možné připravit pomocí sady degenerovaných oligonukleotidů. Chemická syntéza degenerovaných sekvencí se může provést na automatickém

syntetizátoru DNA, a syntetické geny se pak vloží (ligují) do vhodného expresního vektoru. Syntéza degenerovaných oligonukleotidů je způsob v oboru dobře známý (31) a tento způsob byl již využit pro cílený vývoj jiných proteinů (32).

Způsob cílené nebo nenáhodné mutagenese se může využít pro přípravu specifických sekvencí nebo mutací v určitých specifických úsecích. Tento způsob se může využít pro vytvoření variant, které obsahují delece, inserce nebo substituce aminokyselinových zbytků ve známé aminokyselinové sekvenci proteinu. Místa mutací se mohou modifikovat individuálně nebo v sériích např. tak, že se 1) nejdříve substituují konzervativní aminokyselina a pak se provádějí radikálnější změny v závislosti na získaných výsledcích 2) deletují se (odstraní) cílové zbytky a 3) inzerují se (vloží) zbytky stejné nebo jiné třídy do sousedství příslušného místa, nebo se kombinují všechny 3 uvedené způsoby.

Mutagenese nahrazováním alaninem

Mutagenese nahrazováním alaninem ("alanin scanning") je metoda vhodná pro identifikaci určitých zbytků nebo úseků požadovaných proteinů, která jsou výhodnými místy nebo doménami pro mutagenesi (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085, 1989). Při této metodě se identifikují zbytky, nebo skupiny zbytků (např. nabité aminokyselinové zbytky jako Arg, Asp, His, Lys a Glu) a nahradí se neutrální nebo negativní aminokyselinou (nejvýhodněji alaninem nebo polyalaninem). Tyto náhrady aminokyselin mohou ovlivnit interakci aminokyselin se okolním vodným prostředím uvnitř nebo vně buňky. Domény, u kterých se projeví funkční citlivost na substituce, se mohou dále zpřesňovat vnášením dalších změn nebo změnami již substituovaných míst. Takže

zatímco místo pro vložení variace aminokyselinové sekvence je predeterminováno, povaha mutace sama o sobě predeterminována není. Tak např. pro optimalizaci účinnosti mutace v určitém místě je možné provést alanin-nahrazovací nebo náhodnou mutagenезi na cílovém kodonu nebo úseku a exprimovat varianty podjednotek požadovaného proteinu a ty pak testovat na optimální kombinaci a požadovanou aktivitu.

Mutagenезe zprostředkovaná oligonukleotidy

Mutagenезe zprostředkovaná oligonukleotidy je metoda vhodná pro přípravu substitučních, delečních a inzerčních variant DNA (viz např. Adelman et al., DAN 2: 183, 1983). Požadovaná DNA může být změněna tím, že hybridizuje s oligonukleotidem, který obsahuje mutaci DNA templátu, kde templátem je jednořetězcová forma plazmidu nebo bakteriofágu obsahující nezměněnou nebo nativní sekvenci DNA pro požadovaný protein. Po hybridizaci se použije DNA polymeráza pro syntézu celého komplementárního řetězce, takže templát pak obsahuje vložený oligonukleotidový primer a tudíž kóduje vybrané změny v DNA pro daný protein. Obecně se užívají oligonukleotidy velikosti 25 nukleotidů. Optimální oligonukleotid obsahuje 12 až 15 nukleotidů, které jsou plně komplementární k templátu na obou stranách od nukleotidu (případně nukleotidů) kódujícího mutaci. To zajišťuje, že oligonukleotid bude správně hybridizovat s jednořetězcovou templátovou DNA. Oligonukleotidy lze snadno syntetizovat způsoby známými v oboru (viz např. Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5765, 1978).

Kazetová mutagenезe

Dalším způsobem, jak připravit varianty, je kazetová mutagenезe založená na technice, kterou popsali Wells et

al. (Gene 34: 315, 1985). Výchozím materiálem je plazmid (nebo jiný vektor), který obsahuje DNA pro proteinovou podjednotku, která má být mutována. Nejdříve je třeba identifikovat kodon (případně kodony), které mají být v proteinové podjednotce mutovány. Je třeba, aby na každé straně od mutovaného místa bylo jedinečné místo pro restriční endonukleázu. Pokud takové restriční místo neexistuje, je třeba ho v požadované lokalizaci vytvořit pomocí výše popsané mutagenese zprostředkované oligonukleotidem. Poté, co do plazmidu byly vložena restriční místa, plazmid se v těchto místech naštěpí, a tedy linearizuje. Pak se standardním způsobem syntetizuje dvouřetězcový oligonukleotid, který kóduje sekvenci DNA mezi dvěma restričními místy a obsahuje požadovanou mutaci. Každý oligonukleotidový řetězec je syntetizován samostatně a pak spolu hybridizují zase standardním způsobem v oboru známém. tento dvouřetězcový oligonukleotid je nazýván kazetou. Kazeta je přitom navržena tak, aby obsahovala 3'-konec a 5'-konec kompatibilní s konci linearizovaného plazmidu, takže může být přímo do plazmidu ligována. Plazmid pak obsahuje mutovanou sekvenci DNA požadovaného proteinu.

Kombinační mutagenese

Pro vytvoření mutací je také možné použít kombinační mutagenzi. Aminokyselinové sekvence skupiny homologních nebo jinak příbuzných proteinových sekvencí se uspořádají tak, aby bylo dosaženo maximální homologie. Všechny sekvence, které se objeví v dané pozici u všech uspořádaných sekvencí se vyberou a vytvoří se z nich degenerovaná sada kombinančních sekvencí. Kombinační mutagenesí se vytvoří velmi různorodá knihovna variant na úrovni nukleových kyselin. Tak např. směs syntetických oligonukleotidů se enzymaticky liguje do

genových sekvencí tak, že degenerovaná sada potenciálních sekvencí je exprimovatelná jako individuální peptidy, nebo alternativně, jako sada delších fúzních proteinů obsahujících sadu degenerovaných sekvencí.

Různé techniky jsou v oboru známé pro screening vytvářených mutovaných genů. Techniky pro screening velkých genových knihoven často zahrnují klonování knihovny do replikovatelných expresních vektorů, transformování vhodných buněk výslednou knihovnou vektorů, a expresi genů v podmínkách, kde detekce požadované aktivity, tj. v tomto případě vazbu na TRELl nebo jeho receptor, umožňuje relativně snadnou izolaci vektoru kódujícího gen, jehož produkt byl detekován. Každá z technik popisovaných v následujících odstavcích je vhodná k vysoce účinnému a vysokokapacitnímu testování velkého počtu sekvencí vytvářených např. technikami náhodné mutagenese.

Vynález dále poskytuje možnost připravovat mimetika pro redukci proteinových vazebných domén polypeptidu TRELl nebo jeho receptoru, tj. peptidová činidla nebo činidla jiné povahy než peptidy. Peptidová mimetika jsou schopna narušit vazbu TRELl a jeho receptoru. Kritické zbytky TRELl účastníci se procesu molekulového rozpoznávání receptorového polypeptidu nebo příslušného následného intracelulárního ~~proteinu v signální dráze, mohou být určeny a použity pro~~ přípravu peptidových mimetik TRELl nebo jeho receptoru, která kompetitivně nebo nekompetitivně inhibují vazbu TRELl a jeho receptoru (viz např. "Peptide inhibitors of human papilloma virus protein binding to retinoblastoma gene protein", patentové přihlášky EP 412 762 A a EP B31 080 A, na které se tímto odkazujeme).

G. Farmaceutické přípravky

Tím, že předkládaný vynález poskytuje čistý a/nebo rekombinantní TRELL, poskytuje také metodu pro testování kandidátů léčiv, která jsou funkčně agonisty nebo antagonisty, a sice TRELL nebo jeho receptoru. V jednom provedení předkládaného vynálezu se pomocí takového testu hodnotí schopnost sloučeniny modulovat vazbu mezi TRELL a jeho receptorem. Je možné pak vytvářet různé varianty testů podle předkládaného vynálezu, což je odborníkovi zřejmé.

V mnoha programech pro screening léků, které testují celé knihovny sloučenin nebo přírodních extraktů, jsou požadovány metody s velkou účinností a kapacitou zpracovaných vzorků, tj. aby bylo možné maximalizovat počet sloučenin otestovaných za jednotku času. testy, které se provádějí na bezbuněčném systému, jako jsou např. purifikované nebo semipurifikované proteiny, jsou často výhodné jako testy pro tzv. primární screening, který dovoluje rychlý vývoj těchto sloučenin, neboť umožňuje relativně snadnou detekci změn molekulového cíle, ke které dochází působením testované sloučeniny. Avšak toxické působení na buňky a/nebo biologická dostupnost testované sloučeniny mohou být ignorovány v takovém *in vitro* systému, neboť test je primárně zaměřen na působení léčiva na molekulový cíl a projevy změn vazebné afinity s jinými proteiny nebo změny enzymatických vlastností molekulového cíle.

Farmaceutické přípravky podle předkládaného vynálezu obsahují terapeuticky účinné množství TRELL nebo receptoru TRELL, nebo jejich fragmentů nebo mimetik, a případně obsahují farmaceuticky přijatelné nosiče a pomocné látky.

Vynález se tudíž také týká způsobu léčení rakoviny a způsobů stimulace, nebo v určitých případech naopak inhibice, imunitního systému, nebo jeho částí, které

spočívají v podávání farmaceuticky účinného množství sloučeniny podle předkládaného vynálezu nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí nebo derivátů. Přitom odborníkovi je zřejmé, že sloučeniny a způsoby podle vynálezu se mohou kombinovat s řadou terapií.

Přípravek podle předkládaného vynálezu může být formulován pro různé lékové formy a způsoby podávání, včetně systémového, topického nebo lokálního podávání. Pro systémové podávání je výhodné podávání injekční, včetně intramuskulární, intravenózní, intraperitoneální a subkutánní injekce, přičemž přípravek podle předkládaného vynálezu může být formulován jako vodný roztok, výhodně ve fyziologicky kompatibilním pufru jako je např. Hankův nebo Ringerův roztok. Kromě toho přípravek podle předkládaného vynálezu může být formulován v pevné formě pro případné rozpuštění nebo resuspendování bezprostředně před použitím. Předkládaný vynález se také týká lyofilizovaných forem přípravku.

Přípravek podle předkládaného vynálezu se může podávat také perorálním, transmukosálním nebo transdermálním způsobem. V přípravku pro transmukosální nebo transdermální podávání se použijí vhodné látky usnadňující penetraci (penetranty) vzhledem k bariéře, kterou je nutno překonat. Takové penetranty jsou v oboru známy a patří k nim např. pro transmukosální podávání soli žlučové kyseliny, deriváty kyseliny fusidové a detergenty. Transmukosální podávání lze provádět buď nasální aerodisperzí nebo pomocí čípků. Pro perorální podávání je přípravek formulován v obvyklé lékové formě vhodné pro perorální podávání jako jsou kapsle, tablety a tonika. Pro topické podávání může být přípravek ve formě mastí, mazání, gelů nebo krémů, jak je v oboru všeobecně známo.

Výhodně je přípravek podle předkládaného vynálezu ve formě jednotkové lékové dávky a je podáván jedenkrát nebo vícekrát denně. Množství aktivní látky podané v jedné dávce v průběhu léčení je závislé na mnoha různých faktorech. Tak např. na věku a velikosti subjektu, závažnosti a průběhu onemocnění, které se léčí, způsobu a formě podávání, a samozřejmě na úsudku zkušeného lékaře. Avšak účinná dávka může být v rozmezí přibližně 0,005 až 5 mg/kg/den, výhodně přibližně 0,05 až 0,5 mg/kg/den. Odborník sám posoudí, kdy mohou být prospěšné nižší či vyšší dávky.

Genové konstrukty podle předkládaného vynálezu se mohou použít také jako součást protokolu genové terapie pro přenos nukleových kyselin kódujících buďto agonistické nebo antagonistické formy polypeptidu TREL.

Expresní konstrukty TREL se mohou podávat prostřednictvím jakéhokoliv biologicky účinného nosiče, tj. jakéhokoliv farmaceutického přípravku schopného účinně přenést *in vivo* gen pro TREL do buňky. Tento přístup znamená vložit gen do virového vektoru, který může přímo transfekovat buňku, nebo podat plazmidovou DNA, pomocí např. lipozomů, nebo nějakého vnitrobuněčného nosiče, anebo se může jednat o přímou injekci genového konstrukt. Výhodnou metodou je však přenos pomocí virového vektoru.

Farmaceutický přípravek s genovým konstruktem pro genovou terapii se skládá v podstatě ze systému pro přenos genů a vhodného ředidla, nebo se může jednat o matrix umožňující pomalé uvolňování, do které je systém přenášející gen zapuštěn. Alternativně, pokud celý systém pro přenos genů může být připraven intaktní z rekombinantních buněk, např. jako retrovirový vektor, farmaceutický přípravek pak obsahuje jednu nebo několik buněk, které produkují systém pro přenos genů.

Kromě použití pro terapii se oligomery podle předkládaného vynálezu mohou použít jako diagnostické reagentie pro detekci přítomnosti či absence cílové DNA, RNA nebo sekvencí aminokyselin, ke kterým se specificky váží.

Jiným aspektem předkládaného vynálezu je použití pro hodnocení chemické sloučeniny z hlediska její schopnosti reagovat, tj. např. vázat se či jinak fyzikálně asociovat, s polypeptidem TRELL nebo jeho fragmenty. Kromě toho TRELL podle předkládaného vynálezu se může použít v metodách pro hodnocení přirozeně se vyskytujících ligandů nebo receptorů TRELL, a také pro hodnocení chemických látek, které se asociují nebo váží s receptory TRELL.

Jiný aspekt předkládaného vynálezu poskytuje způsob hodnocení chemické látky z hlediska její schopnosti modulovat interakci mezi TRELL a jeho receptorem. Tento způsob znamená smísit TRELL a receptor TRELL v podmínkách, kde taková dvojice je schopna interakce, pak přidat chemickou látku, která se testuje, a detekovat vytvoření a nebo naopak rozpad komplexu. Takové modulující činidlo může být dále hodnoceno testy *in vitro* na aktivitu v bezbuněčném systému a pak se, případně ošetřením buněk nebo podáváním zvířatům, mohou hodnotit účinky.

Příklady provedení vynálezu

Izolace cDNA TRELL

Příklad 1

A) Klonování myšního genu TRELL

cDNA kódující mTRELL byla izolována pomocí PCR z knihovny cDNA z myších peritoneálních makrofágů. Sekvence aminokyselin a umístění transmembránového úseku je typické pro membránové proteiny. Aminokyselinová sekvence mTRELL je zde uvedena jako sekvence id. č. 2 a příslušná sekvence DNA je zde uvedena jako sekvence id. č. 1.

Makrofágové buňky byly získány z peritonea myši Balb/c peritonální laváží a buňky, které adherovaly k plastu do jedné hodiny po odebrání, byly lyzovány a byla z nich extrahována RNA. Byl připraven syntetický oligonukleotidový primer 5' GTTCCAGGCCAGCCTGGG3' ze sekvence myšního erythropoietinu (viz C.B. Shoemaker a L.D. Mistock: "Murine erythropoietin gene: cloning, expression and human gene homology", Mol. Cell. Biol. 6: 849, 1986). Tento primer byl použit pro metodu "5'RACE" (systém 5'RACE od firmy BRL) podle návodu výrobce ve spojení s kotvicím primerem dle BRL. První řetězec cDNA byl připraven z RNA z makrofágů adherujících do jedné hodiny, jak bylo uvedeno výše. Amplifikace byla provedena pomocí termálního DNA cykleru firmy Perkin Elmer a s Taq DNA polymerázou taktéž od Perkin Elmer. Po první denaturaci 5 minut při 94 °C byly podmínky cyklů následující: 35 cyklů sestávající z 30 sekund v 94 °C, 30 sekund v 55 °C a 3 minuty v 72 °C. Závěrečným krokem byla dodatečná extenze při 72 °C a pak byla reakce udržována při 4 °C. Analýza experimentu PCR

na agarózovém gelu ukázala dva amplifikované fragmenty velikosti 650bp a 500 bp. Oba fragmenty byly vyříznuty z gelu, vloženy do vektoru pBS-T a sekvencovány. Ukázalo, že šlo u různé fragmenty. Oba měly na konci shodný oligonukleotid specifický pro stejný erythropoetinový gen, který byl použit jako primer pro PCR syntézu. Northernová analýza pomocí fragmentů náhodně značených ^{32}P ukázala, že hybridizovaly se dvěma různými RNA, přičemž fragment 500 bp hybridizoval s RNA velikosti 1,4 kb v makrofágách. Pro určení orientace cDNA byly v northernové analýze užity ribonukleotidové sondy (ribosondy) značené ^{32}P .

Z určených sekvencí a orientací byly odvozeny dva vnitřní primery pro RNA velikosti 1,4 kb. Ty byly využity pro metodu 5'RACE-PCR. Experiment 5'RACE-PCR poskytl fragment velikosti 750 bp, který byl vložen do vektoru pBS-T a sekvencován. Ukázalo se, že odpovídal 3'-konci RNA o velikosti 1,4 kb, neboť obsahoval polyadenylační signál AATAAA právě před polyadenylovou sekvencí polyA. Uplatnění metody 5'RACE nevedlo k vytvoření žádného pásu. Souprava pro amplifikaci Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) byl použit pro přípravu cDNA knihovny z výše popsaných adherujících makrofágů. Byl použit fragment velikosti 1040 bp získaný PCR pomocí "antisense" a "sense" oligonukleotidových primerů z určené sekvence DNA společně s univerzálními primery ze soupravy. To vedlo k vytvoření fragmentu delšího než bylo původních 1040 bp. Nový fragment, který byl sekvencován, byl delší o 60 bp na 5'-konci (sekvence id. č. 1).

Byla také izolována RNA z myších peritoneálních makrofágů indukovaných thioglykolátem po hodinové adherenci. Hybridizace byla provedena s cDNA pro mTRELl značenou ^{32}P . Obr. 3 ukazuje výsledky northernové analýzy exprese mRNA pro

TRELL v peritoneálních makrofágách myši a v dalších myších orgánech.

Prvních 21 aminokyselin představuje hydrofóbní transmembránovou doménu. V dostupných databázích nebyla nalezena žádná shodná sekvence ani na úrovni nukleotidů ani aminokyselin. Pomocí programu PROSITE a 225 aminokyselinových sekvencí bylo zjištěno, že dotčená sekvence patří do proteinové rodiny TNF. Protein má také různé domény popsané pro LT- α a jiné členy této rodiny (J. Browning et al., *Lymphotoxin- α , a novel member of the TNF family that forms heteromeric complex with lymphotoxin on the surface*, Cell 72: 847, 1993, C.F. Ware et al. "THE ligands and receptors of the lymphotoxin systém", in *Pathways of cytolysis*, G.M. Griffiths and J. Tschopp (Eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 175-218, 1995). Ukázalo se, že tato sekvence je jedinečná. Na úrovni nukleotidů nebo aminokyselin byla pozorována slabá míra identity nebo podobnosti při srovnání s ostatními členy rodiny TNF nebo i s jinými sekvencemi. Prohledávání databáze EST klonů vedlo k odhalení jedné lidské sekvence zcela jasně homologní s touto myší sekvencí. Klon 154742,5' (GenBank, přístupové číslo R55379) z knihovny z prsu, kterou vytvořil Soares, Washington University, velikosti 345 bp vykazoval 89% homologii s myším TRELL. V dostupných databázích nebyla nalezena žádná sekvence, která by souhlasila s dostupným 5' koncem TRELL.

Příklad 2

B) Klonování lidského TRELL

1) Příprava oligonukleotidových sond a primerů pro PCR

Jako základ pro syntézu oligonukleotidových primerů byla využita sekvence lidského EST klonu R55379, která je homologní s myším TRELL. Byly připraveny dva "sense" (souhlasné) oligonukleotidy - 20mery :

LTB-065: 5'CCC TGC GCT GCC TGG AGG AA (nt 70 Až 89 z R55379) a

LTB-066: 5'TGA TGA GGG GAA GGC TGT CT (nt 14 až 33 z R55379)

a jeden "antisense" (s opačným smyslem orientace) 20mer:

LTB-067: 5'AGA CCA GGG CCC CTC AGT GA (nt 251 až 270 z R55379).

2) Identifikace mRNA a zdrojová cDNA knihovna pro klonování TRELL

PolyA+mRNA z lidských jater (katalog. č. 6510-1), sleziny (katalog. č. 6542-1) a lymfatických uzlin (katalog. č. 6594-1) byly zakoupeny od firmy Clontech. PolyA+mRNA z buněk lidských buněčných linií THP-1, U937 a II-23 byly připravenou firmou Biogen, Cambridge, MA. cDNA knihovna z lidských tonsil ve fágu Lambda gt10 a také DNA z této knihovny byly připraveny také v Biogenu.

Na šesti vzorcích RNA byla provedena reverzní transkripce sdružená s polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR). Každá reakce pro syntézu cDNA obsahovala 1 µg polyA+mRNA, 50mM Tris pH 8,3, 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 250mM dNTP, 50 ng náhodných hexamerů (50ng/ µl) a 400 U reverzní transkriptázy Superscript II (Gibco BRL, katalog. č. 6542-1) v celkovém objemu 40 µl. Reakce byla inkubována ve 20°C po 20 minut, ve 42 °C po 50 minut a nakonec v 99 °C 5 minut. Pro následující

PCR pak byla užita jedna pětina každé cDNA reakce nebo 100 až 1000 ng DNA z cDNA knihovny. Byly provedeny dvě PCR reakce pro každý vzorek, jedna s párem primerů LTB-065 a LTB-067, která by vedla ke vzniku produktu o velikosti 201 bp, a druhá reakce s párem primerů LTB-066 a LTB-067, která by poskytla produkt velikosti 257 bp, pokud bude přítomen příslušný transkript ve vzorku. PCR byla provedena ve 10mM Tris pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01% želatině, 10% DMSO, 100 µM dNTP s 30 pmol každého primeru a 5 U polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer, katalog. č. N801-0060). PCR byla provedena v termocykleru Perkin Elmer Cetus Model 480. Podmínky cyklů byly 95°C, 1 minuta, 60 °C, 1 minuta a 72 °C, 1 minuta, a to opakováno v 35 cyklech.

Produkt správné velikosti byl získán z jater, sleziny, lymfatických uzlin, THP-1 a tonsil, ale U937 a II-23 mRNA neposkytly žádný produkt. PCR produkt z jater velikosti 201 bp byl purifikován a použit dále jako sonda pro screening cDNA knihovny.

3) Screening cDNA knihovny

Poté, co bylo pomocí PCR prokázáno, že cDNA knihovna z tonsil obsahuje TREL, 1 milion pfu (jednotek vytvářejících plaky) z Lambda gt10 cDNA knihovny lidských tonsil bylo vyseto na misky Nunc™ v hustotě 1x10⁵ pfu. Byly vytvořeny duplikátní otisky na membránové filtry Schleicher and Shuell BA-S 85 Opitran™. PCR produkt zmíněný výše o velikosti 201 bp byl označen ³²P pomocí náhodných primerů (Feinberg and Vogelstein, Anal. Biochem. 137: 266-267, 1984). Filtry pak byly hybridizovány přes noc při 65 °C ve 400 ml "Plaque screen" pufru (50mM Tris pH 7,5, 1M NaCl, 0,1% difosforečnanu sodného, 0,2% PVP, 0,2% Ficoll) s 10% dextransulfátem, 100 µg/ml tRNA a 6x10⁵ cpm/ml sondy. Po hybridizaci byly filtry

dvakrát opláchnuty "Plaque screen" pufrem a pak dvakrát 2xSSC, 0,1% SDS při 65 °C a poté exponovány na film při -70°C s intenzifikačním stínítkem po dobu 40 hodin.

Dvojitě pozitivní plaky byly přeneseny z původních misek do média SM (100mM NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM Tris pH 7,5) s želatinou. 12 pozitivních plaků pak bylo purifikováno. Lambda DNA získaná minipreparací z 12 purifikovaných plaků byla naštěpena restriktázou NotI a analyzována elektroforézou na 1% agarózovém gelu, pak analyzovány Southernovým přenosem a hybridizována se sondou 210 bp výše zmíněnou.

Klony s nejdelším inzertem (přibližně 2 kb), které hybridizovaly se sondou, byly vybrány pro purifikaci DNA ve velkém měřítku a pro DNA sekvencování. Inzert z každého z těchto klonů byl subklonován do NotI místa plazmidu pBleuescript SK+ (Stratagene, katalog. č. 212205). byly získány sekvence DNA lambda a plazmidové DNA. Klon F1, který obsahoval cDNA inzert velikosti 2006 bp obsahoval intron na 5'konci kódujícího úseku ale neobsahoval úplný čtecí rámeček. Klon A2a, zvaný též PB133 obsahoval cDNA inzert velikosti 1936 bp. Tento klon obsahoval netranslatovaný úsek 3'konce velikosti 543 bp, otevřený čtecí rámeček velikosti 852 bp a netranslatovaný úsek 3'konce, ale neobsahoval polyadenylační signál ani polyA koncovou sekvenci.

Nukleotidová sekvence kódující otevřený čtecí rámeček pro hTRELL cDNA v klonu A2a je zde uvedena jako sekvence id. č. 3. Dedukovaná aminokyselinová sekvence obsahující 284 aminokyselin je zde uvedena jako sekvence id. č. 4. Druhý methionin v pozici 36 je pravděpodobně translační počátek, neboť toto místo nejlépe odpovídá požadavkům kladeným na takový počátek podle Kozaka.

Pomocí identifikovaných sekvencí cDNA byla určena cDNA kódující TRELL. Ze sekvencí výše popsanych (tj. sekvence

id. č. 3) byla dedukována aminokyselinová sekvence TRELL (tj. sekvence id. č. 4). Přitom je zřejmé, že v souladu se stavem techniky, odborník by byl schopen provést v těchto sekvencích účelné záměny, inserce nebo delece, a tím by získal řadu různých molekul s v podstatě shodnou biologickou nebo imunologickou aktivitou, jakou mají molekuly popisované v této přihlášce.

4) Northernová analýza exprese lidského TRELL

Fragment PpuM1/BstX1 z lidského klonu 2a velikosti 440 bp byl označen ^{32}P pomocí náhodných primerů a použit jako sonda pro testování komerčně dostupných northernových otisků obsahujících RNA z různých tkání člověka. Tato northernová analýza ukázala, že sonda hybridizovala s jediným druhem mRNA velikosti 1,4 až 1,6 kb. TRELL je exprimován ve většině orgánů imunitního systému, tj. ve slezině, lymfocytech periferní krve (pbl), lymfatických uzlinách, apendixu, ale relativně málo v thymu, fetálních játrech (které jsou zdrojem předchůdců lymfocytů) a kostní dřeni (viz obr. 4). Takže primárně jsou to orgány sekundárního imunitního systému, které exprimují TRELL. Ale exprese TRELL byla detekována i ve vaječníku, prostatě, tenkém střevu, tlustém střevu, srdci, mozku, placentě, plicích, játrech, kosterním svalstvu, ledvinách a pankreatu. Exprese byla relativně nízká ve varlatech, játrech, ledvinách a thymu. Tento expresní vzorec ukazující na široce rozšířenou expresi, připomíná expresi ligandu TRAIL, až na to, že TRAIL je málo exprimován v srdci a mozku.

Příklad 3

C) Izolace receptoru vážícího ligand TRELL

Ligandy rodiny TNF se mohou použít pro identifikaci a klonování receptorů. S využitím popsaných sekvencí tRELL je možné fúzovat 5'-konec extracelulární domény TRELL ligandu, který tvoří vazebnou sekvenci pro receptor, k markerové nebo značkovací sekvenci a pak přidat vedoucí sekvenci, která podpoří sekreci ligandu v některém z mnoha možných expresních systémů. Jeden příklad takového postupu popsali Browning et al (JBC 271: 8618-8626, 1996), kdy ligand LT- β byl secernován v takové formě. Vedoucí sekvence VCAM byla připojena ke krátké značkovací sekvenci peptidu myc s extracelulární doménou LT- β . Sekvence VCAM byla použita proto, aby napomohla sekreci molekuly LT- β , která je normálně vázána na membránu. Secernovaný protein si ponechává značku myc na svém N-konci, která nijak nesnižuje schopnost vázat se na receptor. Takový secernovaný protein se může exprimovat buďto v přechodně transfekovaných buňkách COS nebo v podobném systému, např. vektorech odvozených od EBNA, systému hmyzí buňky a bakuloviru nebo *Pichia* sp. apod. Jako zdroj označeného ligandu se může využít nepurifikovaný buněčný supernatant.

Buňky exprimující receptor je možné identifikovat tím, že se exponují označenému ligandu. Buňky s navázaným ligandem se pak identifikují pomocí průtokové cytometri FACS, když se označí značka myc protilátkou proti peptidu myc (anti-myc, 9E10) a pak fykoerytrinem (nebo obdobnou značkou) značeným myším imunoglobulinem. Buňky pozitivní ve FACS se snadno identifikují a slouží pak jako zdroj RNA kódující receptor. Z této RNA pak může být připravena standardním postupem expresní knihovna a rozdělena do podskupin ("pools"). Tyto

podskupiny klonů se pak transfekují do vhodných hostitelských buněk a vazba označeného ligandu na transfekované buňky s receptorem se identifikuje pomocí mikroskopického vyšetření poté, co se navázaný myc peptid označí anti-myším imunoglobulinem označeným enzymem, např. galaktosidázou, alkalickou fosfatázou nebo luciferázou. Jakmile se jednou identifikuje pozitivní podskupina klonů, zmenšuje se pak velikost podskupin dokud není identifikována cDNA kódující receptor. Celá tato procedura může být provedena buďto s myším nebo lidským TREL, přičemž jedna z nich povede snadněji k receptoru.

Buňky, reagenty a metody použité v př. 1 až 3

Všechny buňky byly získány z Americké sbírky mikroorganismů American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, kromě klonu 13 buněk WEHI 164, které poskytl Dr. Kawashima (Geneva Biomedical Research Institute, Geneva, Switzerland). Subklon HT29 (HT29-14) byl již dříve popsán (Browning et al., 1996) a subklon ME180 senzitivní k TNF poskytl Dr. Carl Ware. Hybridom T-buněk II-23 byl již také popsán dříve (Browning et al. 1991).

Myši Balb/c byly injikovány peritoneálně 3 dny před usmrcením 1,5 ml thioglykolátové suspenze (Difco lab., MI). Buňky pak byly odebrány z peritoneální dutiny a kultivovány v hustotě 106 buněk/ml po 1 hodinu v médiu DMEM (Gibco Lab.). Neadherující buňky byly odstraněny opláchnutím misek a adherující buňky, téměř výlučně makrofágy, byly lyzovány činidlem Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc.) a byla z nich extrahována RNA.

Rekombinantní lidské proteiny TNF, LTa, LTa1/b2, a také protilátky k těmto proteinům jakož i fúzní proteiny

receptor-Ig byly již dříve popsány (Browning et al., 1995). Také protilátka anti-CD40L nazvaná 5C8 byla publikována. Polyklonální sérum anti-hTRELL bylo připraveno tak, že se injikoval čistý rekombinantní hTRELL v CFA do lymfatických uzlin, jak bylo již popsáno (Browning a Ribolini, 1989). Po dvou měsících, kdy byla viditelná odpověď proti hTRELL, byly purifikovány imunoglobuliny pomocí sefarozy s proteinem-A (Protein-A-Sepharose).

Klonování myšního TRELL

Byl připraven syntetický oligonukleotidový primer 5' GTTCCAGGCCAGCCTGGG3' ze sekvence myšního erythropoetinu a tento primer byl použit pro metodu "5'RACE" (systém 5'RACE od firmy BRL) podle návodu výrobce ve spojení s kotvicím primerem dle BRL. První řetězec cDNA byl připraven z RNA z makrofágů adherujících do jedné hodiny, jak bylo uvedeno výše. Amplifikace byla provedena pomocí termálního DNA cykleru firmy Perkin Elmer s Taq DNA polymerázou taktéž od Perkin Elmer. Po první denaturaci 5 minut při 94 °C byly podmínky cyklů následující: 35 cyklů sestávající z 30 sekund v 94 °C, 30 sekund v 55 °C a 3 minuty v 72 °C. Závěrečným krokem byla dodatečná extenze při 72 °C. Analýza experimentu PCR na agarózovém gelu ukázala dva amplifikované fragmenty velikosti 650 bp a 500 bp. Oba fragmenty byly vyříznuty z gelu, vloženy do vektoru pBS-T a sekvencovány. Northernová analýza pomocí fragmentů náhodně značených ³²P ukázala, že fragmentt 500 bp hybridizoval s RNA velikosti 1,4 kb v makrofágách. Pro určení orientace cDNA byly v northernové analýze v obou směrech užity ribonukleotidové sondy (ribosondy) značené ³²P.

Z určených sekvencí a orientací byly odvozeny dva vnitřní primery pro RNA velikosti 1,4 kb, a sice

5'TCAGGTGCACTTTGATGAGG3' a 5'CTGTCAGCTCCTCCTGAG3', které byly využity pro metodu 5'RACE-PCR. Experiment 5'RACE-PCR poskytl fragment velikosti 750 bp, který byl vložen do vektoru pBS-T a sekvencován. Ukázalo se, že odpovídal 3'konci RNA o velikosti 1,4 kb, neboť obsahoval polyadenylační signál AATAAA právě před polyadenylovou sekvencí polyA. Uplatnění metody 5'RACE nevedlo k vytvoření žádného pásu. Souprava pro amplifikaci Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) byl použit pro přípravu cDNA knihovny z výše popsanych adherujících makrofágů. Byl použit fragment velikosti 1040 bp získaný PCR pomocí antisense a sense oligonukleotidových primerů z určené sekvence DNA společně s univerzálními primery ze soupravy. To vedlo k vytvoření fragmentu o 60 bp delšího než bylo původních 1040 bp.

Klonování lidského TRELL

Průzkum databáze EST klonů ukázal jeden klon, který byl zjevně homologní s myší sekvencí. Tento klon 154742 (GenBank, přístupové č. R55379) obsahuje sekvenci velikosti 345 bp s 89% homologií s myší cDNA. Z EST klonu byly odvozeny dva oligonukleotidové primery, 5'CCC TGC GCT GCC TGG AGG AA3' a 5'AGA CCA GGG CCC CTC AGT GA3', které byly použity pro screening různých tkání a knihoven pomocí RT-PCR na přítomnost transkriptů hTRELL. Produkty správné velikosti byly získány z jater, sleziny, lymfatických uzlin, THP-1 a tonsil, ale U937 a II-23 mRNA neposkytly žádný produkt. PCR produkt velikosti 201 bp byl klonován a použit dále jako sonda pro screening Lambda gt10 cDNA knihovny z lidských tonsil. 10^6 pfu (jednotek vytvářejících plaky) z Lambda gt10 cDNA knihovny lidských tonsil bylo vyseto na misky Nunc™ v hustotě 1×10^5 pfu. Byly vytvořeny duplikátní otisky na nitrocelulózové filtry 20x20 a filtry pak byly hybridizovány

se sondou označenou pomocí náhodných prmerů. Filtry byly hybridizovány přes noc při 65 °C ve 400 ml "Plaque screen" pufru (50mM Tris pH 7,5, 1M NaCl, 0,1% difosforečnanu sodného, 0,2% PVP, 0,2% Ficoll) s 10% dextransulfátem, 100 µg/ml tRNA a 6×10^5 cpm/ml sondy. Po hybridizaci byly filtry dvakrát opláchnuty "Plaque screen" puftrem a pak dvakrát 2xSSC, 0,1% SDS při 65 °C. Lambda DNA byla připravena minipreparací z pozitivních kolonií a klony s nejdelším inzertem byly vybrány pro purifikaci DNA ve velkém měřítku a pro DNA sekvencování. Inzert z každého z těchto klonů byl subklonován do NotI místa plazmidu pBleuescript SK+ (Stratagene, katalog. č. 212205).

Analýza RNA

Buďto fragment PpuM1/BstX1 velikosti 0,45 kb nebo fragment NarI/NotI velikosti 1,25 kb z hTRELL cDNA byl označen pomocí náhodných primerů a použit jako sonda pro testování lidských a myších tkání, zakoupených jako notrthernové otisky od firmy Clontech, northernovou analýzou. RNA z myších tkání a buněčných linií byla extrahována pomocí činidla TRI-Reagent. Northernová analýza byla provedena v podstatě postupem, který popsali Chicheportiche a Vassalli (1994) se 4 µg celkové RNA a sondou z mTRELL cDNA značenou ^{32}P .

Příklad 4

Přiřazení v chromosomu

Panel DNA z monochromozomových buněčných hybridů (HGMP Resource Centre, Hinxton, Cambridge, UK) byl použit pro amplifikaci fragmentu velikosti 340 bp pomocí PCR s primery

vybranými podle 3'-koncového netranslatovaného úseku, které nebyly homologní s myší sekvencí (5'AGTCGTCCTCCAGGCTGCCGGCT3' a 5'CCTGAAGTGGGGTCTTCTGGA3'). Amplifikace byla provedena ve 40 cyklech 94°C, 30 sekund, 65 °C, 90 sekund a 72 °C, 90 sekund. Výsledné produkty byly detekovány na agarózovém gelu obarveném ethidiumbromidem.

Příklad 5

Expresa rekombinantního proteinu hTRELL

Byl připraven konstrukt pro expresi rozpustného produktu, který kombinoval vedoucí sekvenci VCAM, značku peptidu myc a extracelulární doménu hTRELL podobně jak bylo již popsáno pro LTb (Browning et al., 1996). Byly izolovány následující fragmenty: NotI fragment s tupým koncem kódující vedoucí sekvenci VCAM, pár oligonukleotidů kódující značkovací peptid myc (5'-konec tupý, 3'PpuM1), které byly popsány výše, a fragmenty TRELL PpuM1/BstX1 velikosti 0,45 kb a BstX1/NotI velikosti 0,65 kb. Všechny čtyři fragmenty byly ligovány do vektoru pBleuescript SK+ naštěpeného NotI a ošetřeného fosfatázou. Inzert NotI z tohoto vektoru byl přenesen do vektoru pFastTRELL (Gibco BRL) a použit pro přípravu rekombinantního bakuloviru. Rozpustný TRELL byl připraven tak, že se infikovaly hmyzí buňky HiFive™ infekcí MOI 10 a po 2 dnech se sbíralo médium. Do média byly přidány následující látky: pufr HEPES do výsledné koncentrace 25mM, pH 7,4, 1mM AEBSF (Pierce) a 1 mg/ml pepstatinu. Médium se pak filtrovalo a koncentrovalo 10x ultrafiltrací přes hranový filtr Amicon 10 kDa. Koncentrované médium obsahující TRELL se přímo nanaslo na kolonu SP Sepharose Fast Flow, která se promyla 25mM HEPES puforem pH 7,0 s 0,4M NaCl. TRELL byl pak

eluován stejným pufrům s 0,6M NaCl. Purifikovaný TRELL byl pak podroben analýze velikosti.

Příklad 6

Analýza sekrece

Vektory pro expresi založenou na EBNA byly konstruovány pomocí vektoru CH269, což je modifikovaná verze pEBVHis ABC (Invitrogen), kde byl odstraněn EBNA gen a histidinová značka. Fragment hTNF velikosti 0,71 kb ve vektoru pFastbac poskytly Dr. P. Pescamento a A. Goldfeld. Inzert SnaBI/XhoI byl ligován do míst PvuII/XhoI vektoru CH269. Genomový inzert TNF obsahující delecii štěpných míst 1-12 poskytl jako dar Dr. G. Kollias, a A. Goldfeld ho vložil do vektoru CH269. NotI inzert hTRELL velikosti 1,8 kb z klonu A2a, fragment velikosti 0,98 kb obsahující hCD40L cDNA od Dr. E. Garbera a NotI inzert velikosti 1,46 kb obsahující hLTa (Browning et al, 1995) byly ligovány do NotI místa vektoru CH269. HindIII inzert velikosti 0,81 kb obsahující kódující úsek hLTb s modifikovaným počátkem (Browning et al., 1995) byl ligován do HindIII místa vektoru CH269. Buňky EBNA-293 byly transfekovány různými vektory CH269 společně s vektorem GFP pomocí lipofectaminu a pak v PBS s 5mM EDTA použity pro analýzu FACS nebo po dvou dnech byly buňky použity pro metabolické značení. Oba způsoby využívají následujících protilátek: hTRELL králičí polyklonální frakci Ig, hTNF monoklonální protilátka 104c, hLT monoklonální protilátka AG9, LTa1/b2 monoklonální protilátka B9 a CD40L monoklonální protilátka 5c8. Analýza FACS byla prováděna v médiu RPMI obsahujícím 10% FBS a 50 µg/ml tepelně agregovaného lidského IgG s protilátkami v koncentraci 5 µg/ml. Fykoerytrinem

zanačená anti-myší nebo králičí protilátka IgG (Jakson ImmunoResearch) byly použity k detekci vazby protilátky. Živé transfekované buňky značené GFP byly pomocí FACS vybrány. Pro imunoprecipitaci byly buňky 2 dny po transfekci opláchnuty PBS a přeneseny do média MEM bez met/cys obsahujícího 200 μ Ci/ml TransLabel (ICN). Pak byl odebrán supernatant a provedena imunoprecipitace podle Browninga et al. (1995).

Příklad 7

Testy cytotoxicity

Testy buněčného růstu byly prováděny, jak bylo již dříve publikováno (Browning a Ribolini, 1989). Pro mikroskopické vyhodnocování byly buňky HT29-14 vysety do 12jamkových misek v hustotě 200 000 buněk/jamku a pěstovány 2 dny. Lidský TRELL, TNF, lymfotoxin-alb2 (Browning et al., 1995) nebo anti-fas (CH11, Kamaya) byly přidány společně s 80 U/ml lidského interferonu-g. Po 26 hodinách se médium odstranilo, společně s mnoha mrtvými buňkami, které se oddělily od plastové jamky po ošetření cytokiny nebo anti-fas. Zbylé buňky byly fixovány 80% etanolem a opláchnuty PBS s 1 mg/ml barviva Hoechst. Barva byla odstraněna po dvou minutách, buňky byly opláchnuty PBS a vyšetřovány fluorescenční mikroskopií.

Výsledky jsou ukázány v následujících tabulkách.

Tab. 2.

Vazebná místa lidského TRELL a cytotoxické působení na různé buněčné linie

Buněčná linie	Typ	Vazba TRELL	Cytotoxicita ^a
Buňky hematopoetické řady			
Jurkat	T-lymfom	-	-
SKW 6,4	EBV B-buňky		-
Namalwa	Burkittův lymfom	-	-
K562	promyelocyty	+	-
THP-1	monocytární leukemie	++	-
Ostatní bunky			
HT29	adenokarcinom tlustého střeva	+	++ ^b
ME-180	cervikální karcinom		-
HeLa	cervikální karcinom		- ^d
MCF-7	adenokarcinom prsu		+/-
293	buňky embryonálních ledvin	+	nd ^c
Cos	fibroblasty ledvin	+	nd

^a 3 až 5denní proliferační test v přítomnosti či nepřítomnosti lidského interferonu γ

^b cytotoxicita byla pozorována pouze v přítomnosti lidského interferonu γ

^c neměřeno

^d morfologické změny

Tab. 3

Rozdělení členů rodiny TNF do skupin podle cytotoxicity

Skupina	Aktivace receptoru
Silné induktory apoptózy mnoha buněčných typů	TNF, Fas, TRAIL-R ^a , DR-3
Slabé induktory pouze u některých buněčných typů	LTb-R, TRELL-R ^a , CD30
Nemohou indukovat buněčnou smrt, za určitých podmínek působí antoproliferativně	CD27, CD40, OX-40

^a tyto receptory nebyly dosud identifikovány

Seznam citované literatury

1. Smith et al. 1990; Kohno et al 1990; Loetscher et al 1990; Schall et al 1990.
2. See Jones et al., 1989; Eck et al., 1992.
3. K. Tracey, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 255 (1992); A. Waage, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 275 (1992).
4. G. D. Roodman, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 117 (1992).
5. A. Nakane, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 285 (1992); I. A. Clark et al., in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 303 (1992); G. E. Grau et al., in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 329 (1992); P-F. Piguet, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 341 (1992); G. H. Wong et al., in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 371 (1992).
6. S. Malik, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 407 (1992).
7. D. A. Fox, Am. J. Med., 99, 82 (1995).
8. D. Goeddel et al., Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 51, 597 (1986); G. Trinchieri, in Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, B. Beutler (Ed.), Raven Press, NY, p 515 (1992).
9. L. A. Tartaglia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9292 (1991); L.A. Tartaglia and D. V. Goeddel, Immunol. Today, 13, 151 (1992).
10. B. Luettig et al., J. Immunol., 143, 4034 (1989); M. Kriegler et al., Cell, 53, 45 (1988).
11. C. F. Ware et al., in Pathways for Cytolysis, G. M. Griffiths and J. Tschopp (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p175-218 (1995).
12. N. Paul et al., Ann. Rev. Immunol., 6, 407 (1988).
13. P.D. Crowe et al., Science, 264, 707 (1994). (J. Browning et al., Cell, 72, 847 (1993); J. Browning et al., J. Immunol., 154, 33 (1995).

14. P. De Togni et al., Science, 264,703 (1993); T.A. Banks et al., J. Immunol., 155, 1685 (1995).
15. J. Browning and A. Ribolini, J. Immunol., 143,1859 (1989); J. Browning et al., J. Exp. Med., 183, 867 (1996).
16. T. Suda et al., J. Immunol., 154, 3806 (1995)(T. Suda et al., J. Immunol., 154, 3806 (1995).
17. B.C. Trauth et al., Science, 245,301 (1989); S. Yonehara et al., J. Exp. Med., 169,1747 (1989); S. Nagata and P. Goldstein, Science, 267, 1449 (1995); M. H. Falk et al., Blood, 79, 3300 (1992).
18. F. Rieux-Laucat et al., Science, 268,1347 (1995); T. Takahashi et al., Cell, 76,969 (1994); R. Watanabe-Fukunaga et al., Nature, 356, 314 (1992).
19. P. R. Galle and al., J. Exp. Med., 182, 1223 (1995).
20. F. Silvestris and al., Clin. Immunol. Immunopathol., 75, 197 (1995).
21. P.D. Katsikis et al., J. Exp. Med., 181, 2029 (1995); A. D. Badley et al., J. Virol., 70, 199 (1996).
22. S. Wiley et al., Immunity, 3, 673 (1995).
23. J. F. Gauchat et al., FEBS Lett., 315, 259 (1993); S. Funakoshi et al., Blood, 83, 2787 (1994).
24. R. C. Allen et al., Science, 259, 990 (1993).
25. L. Biancone et al., Kidney-Int., 48, 458 (1995); C. Mohan et al., J. Immunol., 154, 1470 (1995).
26. J. Ruby and al., Nature Medicine, 1, 437 (1995).
27. Z. Wang et al., J. Immunol., 155, 3722 (1995); A. M. Cleary and al., J. Immunol., 155, 3329 (1995).
28. S. Hess and H. Engelman, J. Exp. Med., 183, 159 (1996).
29. R. G. Goodwin et al, Cell, 73, 447 (1993); Goodwin et al, Eur. J. Immunol., 23, 2631 (1993); C. A. Smith et al., Cell, 73, 1349 (1993).
30. See, for example, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D.

- Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).
31. See for example, Narang, SA (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1981) Recombinant DNA. Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477.
 32. See, for example, Scott et al. (1990) Science 249:386-390; Roberts et al. (1992) PNAS 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) Science 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) PNAS 87: 6378-6382; as well as U.S. Patents Nos. 5,223,409, 5,198,346, and 5,096,815.
 33. M.T. Abreu-Martin, A. Vidrich, D.H. Lynch and S.R. Targan. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF- α and ligation of Fas ligand. J. Immunol. 155: 4147-4154, 1995.
 34. K. Agematsu, T. Kobata, F.-C. Yang, T. Nakazawa, K. Fukushima, M. Kitahara, T. Mori, K. Sugita, C. Morimoto and A. Komiyama. CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. Eur. J. Immunol. 25: 2825-2829, 1995.
 35. R. Amakawa, A. Hakem, T.M. Kundig, T. Matsuyama, J.J.L. Simard, E. Timms, A. Wakeham, H.-W. Mittrucker, H. Griesser, H. Takimoto, R. Schmits, A. Shahinian, P.S. Ohashi, J.M. Penninger and T.W. Mak. Impaired negative selection of T cells in Hodgkin=s disease antigen CD30-deficient mice. Cell 84: 551-562, 1996.
 36. J.-L. Bodmer, K. Burens, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, M. Thome, T. Bornand, M. Hahne, M. Schroeter, K. Becker, A. Wilson, L.E. French, J.L. Browning, H.R. MacDonald, and J. Tschopp. TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and fas (apo-1/CD95). Immunity 6: 79-88, 1997.
 37. J. Brojatsch, J. Naughton, M.M. Rolls, K. Ziegler and J.A.T. Young. Carl, a TNFR-related protein is a cellular receptor for cytopathic avian leukemia-sarcoma viruses and mediates apoptosis. Cell 87: 845-855, 1996.
 38. J.L. Browning, M.J. Androlewicz and C.F. Ware. Lymphotoxin and an associated 33-kDa glycoprotein are expressed on the surface of an activated human T cell hybridoma. J. Immunol. 147: 1230-7, 1991.

39. J.L. Browning, K. Miatkowski, D.A. Griffiths, P.R. Bourdon, C. Hession, C.M. Ambrose and W. Meier. Preparation and characterization of soluble recombinant heterotrimeric complexes of human lymphotoxins alpha and beta. J. Biol. Chem. 271: 8618-26, 1996.
40. J.E. Castro, J.A. Listman, B.A. Jacobson, Y. Wang, P.A. Lopez, S. Ju, P.W. Finn and D.L. Perkins. Fas Modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. Immunity 5: 617-627, 1996.
41. C.-Y.A. Chen and A.-B. Shyu. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends in Biol. Sci. 20: 465-470, 1995.
42. Y. Chicheportiche, C. Ody and P. Vassalli. Identification in mouse macrophages of a new 4 kb mRNA present in hematopoietic tissue which shares a short nucleotide sequence with erythropoietin mRNA. Biochim. Biophys. Res. Comm. 209: 1076-1081, 1995.
43. A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, G.-L. Yu, R.H. Lyons, M. Garg, D.R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni and V.M. Dixit. Signal transduction by DR3 a death-domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science 274: 990-992, 1996.
44. P. DeTogni et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science 264: 703-7, 1994.
45. M.A. DeBenedette, N.R. Chu, K.E. Pollok, J. Hurtako, W.F. Wade, B.S. Kwon and T.H. Watts. Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. J. Exp. Med. 181: 985-992, 1995.
46. M. Degli-Esposti, T. Davis-Smith, W.S. Din, P.J. Smolak, R.G. Goodwin and C.A. Smith. Activation of the lymphotoxin- β receptor by cross-linking induces chemokine production and growth arrest in A375 melanoma cells. J. Immunol. 158: 1756-1762, 1997.
47. T.M. Foy, A. Aruffo, J. Bajorath, J.E. Buhlmann and R.J. Noelle. Immune regulation by CD40 and its ligand gp39. Ann. Rev. Immunol. 14: 591-617, 1996.
48. H.J. Gruss, N. Boiani, D.E. Williams, R.J. Armitage, C.A. Smith and R.G. Goodwin. Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. Blood 83: 2045-56, 1994.
49. H.J. Gruss and S.K. Dower. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. Blood 85: 3378-404, 1995.
50. J. Kitson, T. Raven, Y.-P. Jiang, D.V. Goeddel, K.M. Giles, K.-T. Pun, C.J. Grinham, R. Brown and S.N. Farrow. A death domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature 384: 372-375, 1996.

51. S.Y. Lee, C.G. Park and Y. Choi. T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor-associated factors. J. Exp. Med. 183: 669-674, 1996.
52. R.I. Montgomery, M.S. Warner, B.J. Lum and P.G. Spear. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell 87: 427-436, 1996.
53. S. Nagata. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365, 1997.
54. R.M. Pitti, S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J. Biol. Chem. 1996.
55. C.A. Smith, T. Farrah and R.G. Goodwin. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 76: 959-62, 1994.
56. G.L. Smith. Virus strategies for evasion of the host response to infection. Trends in Microbiol. 3: 81-88, 1994.
57. E. Strueber and W. Strober. The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell independent humoral immune response. J. Exp. Med. 183: 979-989, 1996.
58. H.-K. Sytwu, R.S. Liblau and H.O. McDevitt. The roles of Fas/Apo-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. Immunity 5: 17-30, 1996.
59. P. Vassalli. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Ann. Rev. Immunol. 10: 411-452, 1992.
60. L. Zheng, G. Fisher, R.E. Miller, J. Peschon, D.H. Lynch and M.J. Lenardo. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. Nature 377: 348-351, 1995.

SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1168 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: protein příbuzný rodině TNF

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 2..676

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

G GTG CTG AGC CTG GGC CTG GCG CTG GCC TGC CTT GGC CTC CTG CTG	46
Val Leu Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
GTC GTG GTC AGC CTG GGG AGC TGG GCA ACG CTG TCT GCC CAG GAG CCT	94
Val Val Val Ser Leu Gly Ser Trp Ala Thr Leu Ser Ala Gln Glu Pro	
20 25 30	
TCT CAG GAG GAG CTG ACA GCA GAG GAC CGC CGG GAG CCC CCT GAA CTG	142
Ser Gln Glu Glu Leu Thr Ala Glu Asp Arg Arg Glu Pro Pro Glu Leu	
35 40 45	
AAT CCC CAG ACA GAG GAA AGC CAG GAT GTG GTA CCT TTC TTG GAA CAA	190
Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp Val Val Pro Phe Leu Glu Gln	
50 55 60	
CTA GTC CGG CCT CGA AGA AGT GCT CCT AAA GGC CGG AAG GCG CGG CCT	238
Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Ala Arg Pro	
65 70 75	
CGC CGA GCT ATT GCA GCC CAT TAT GAG GTT CAT CCT CGG CCA GGA CAG	286
Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln	
80 85 90 95	
GAT GGA GCA CAA GCA GGT GTG GAT GGG ACA GTG AGT GGC TGG GAA GAG	334
Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu	
100 105 110	

ACC AAA ATC AAC AGC TCC AGC CCT CTG CGC TAC GAC CGC CAG ATT GGG Thr Lys Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asp Arg Gln Ile Gly 115 120 125	382
GAA TTT ACA GTC ATC AGG GCT GGG CTC TAC TAC CTG TAC TGT CAG GTG Glu Phe Thr Val Ile Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val 130 135 140	430
CAC TTT GAT GAG GGA AAG GCT GTC TAC CTG AAG CTG GAC TTG CTG GTG His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val 145 150 155	478
AAC GGT GTG CTG GCC CTG CGC TGC CTG GAA GAA TTC TCA GCC ACA GCA Asn Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala 160 165 170 175	526
GCA AGC TCT CCT GGG CCC CAG CTC CGT TTG TGC CAG GTG TCT GGG CTG Ala Ser Ser Pro Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu 180 185 190	574
TTG CCG CTG CGG CCA GGG TCT TCC CTT CGG ATC CGC ACC CTC CCC TGG Leu Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp 195 200 205	622
GCT CAT CTT AAG GCT GCC CCC TTC CTA ACC TAC TTT GGA CTC TTT CAA Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln 210 215 220	670
GTT CAC TGAGGGGCT TGCTCTCCCA GATTCCTTAA ACTTTCCTG GCTCCAGGAG Val His 225	726
CATCACCACA CCTCCCTACC CCACCCCCAC TCCTCCACCC CCTCGCTGCT CCTTGGTCCA	786
GTCTGTCTC TCCTCAAAGG CAGCCAGAGC TTGTTACAT GTTTCATTG CACAGACGTA	846
TCCTTGCTCT TCTTAACATC CCATCCCACC ACAACTATCC ACCTCACTAG CTCCTCAAAGC	906
CCCTACTTAT CCCTGACTCC CCCACCCACT CACCCGACCA CGTGTTTATT GACTTTGTGC	966
ACCAGGCACT GAGATGGGCT GGACCTGGTG GCAGGAAGCC AGAGAACCTG GGACTAGGCC	1026
AGAAGTTCCC AACTGTGAGG GGGAAGAGCT GGGGACAAGC TCCTCCCTGG ATCCCTGTGG	1086
ATTTTGAAAA GATACTATTT TTATTATTAT TGTGACAAAA TGTTAAATGG ATATTAAAGA	1146
GAATAAATCA TGATTTCTCT TC	1168

28.02.99

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 225 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

```

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

```

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1373 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: protein příbuzný rodině TNF

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..852

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

ATG TCA TTG TTA GAC TTT GAA ATT TCC GCC CGC CGG CTC CCC CTC CCC	48
Met Ser Leu Leu Asp Phe Glu Ile Ser Ala Arg Arg Leu Pro Leu Pro	
1 5 10 15	
CGA TCC CTC GGG TCC CGG GAT GGG GGG GCG GTG AGG CAG GCA CAG CCC	96
Arg Ser Leu Gly Ser Arg Asp Gly Gly Ala Val Arg Gln Ala Gln Pro	
20 25 30	
CCC GCC CCC ATG GCC GCC CGT CGG AGC CAG AGG CGG AGG GGG CGC CGG	144
Pro Ala Pro Met Ala Ala Arg Arg Ser Gln Arg Arg Arg Gly Arg Arg	
35 40 45	
GGG GAG CCG GGC ACC GCC CTG CTG GTC CCG CTC GCG CTG GGC CTG GGC	192
Gly Glu Pro Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly	
50 55 60	
CTG GCG CTG GCC TGC CTC GGC CTC CTG CTG GCC GTG GTC AGT TTG GGG	240
Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly	
65 70 75 80	
AGC CGG GCA TCG CTG TCC GCC CAG GAG CCT GCC CAG GAG GAG CTG GTG	288
Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu Val	
85 90 95	
GCA GAG GAG GAC CAG GAC CCG TCG GAA CTG AAT CCC CAG ACA GAA GAA	336
Ala Glu Glu Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu	
100 105 110	
AGC CAG GAT CCT GCG CCT TTC CTG AAC CGA CTA GTT CGG CCT CGC AGA	384
Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg Pro Arg Arg	
115 120 125	
AGT GCA CCT AAA GGC CGG AAA ACA CGG GCT CGA AGA GCG ATC GCA GCC	432
Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg Ala Ile Ala Ala	
130 135 140	

CAT TAT GAA GTT CAT CCA CGA CCT GGA CAG GAC GGA GCG CAG GCA GGT His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly 145 150 155 160	480
GTG GAC GGG ACA GTG AGT GGC TGG GAG GAA GCC AGA ATC AAC AGC TCC Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Ala Arg Ile Asn Ser Ser 165 170 175	528
AGC CCT CTG CGC TAC AAC CGC CAG ATC GGG GAG TTT ATA GTC ACC CGG Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg 180 185 190	576
GCT GGG CTC TAC TAC CTG TAC TGT CAG GTG CAC TTT GAT GAG GGG AAG Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys 195 200 205	624
GCT GTC TAC CTG AAG CTG GAC TTG CTG GTG GAT GGT GTG CTG GCC CTG Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu 210 215 220	672
CGC TGC CTG GAG GAA TTC TCA GCC ACT GCG GCC AGT TCC CTC GGG CCC Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro 225 230 235 240	720
CAG CTC CGC CTC TGC CAG GTG TCT GGG CTG TTG GCC CTG CGG CCA GGG Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly 245 250 255	768
TCC TCC CTG CGG ATC CGC ACC CTC CCC TGG GCC CAT CTC AAG GCT GCC Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala 260 265 270	816
CCC TTC CTC ACC TAC TTC GGA CTC TTC CAG GTT CAC TGAGGGGCCC Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His 275 280	862
TGGTCTCCCC ACAGTCGTCC CAGGCTGCCG GCTCCCCTCG ACAGCTCTCT GGGCACC0GG	922
TCCCCTCTGC CCCACCCTCA GCCGCTCTTT GCTCCAGACC TGCCCCTCCC TCTAGAGGCT	982
GCCTGGGCCT GTTCACGTGT TTTCCATCCC ACATAAATAC AGTATTCCCA CTCTTATCTT	1042
ACAACTCCCC CACCGCCAC TCTCCACCTC ACTAGCTCCC CAATCCCTGA CCCTTTGAGG	1102
CCCCCAGTGA TCTCGACTCC CCCCTGGCCA CAGACCCCCA GGGCATTGTG TCACTGTAC	1162
TCTGTGGGCA AGGATGGGTC CAGAAGACCC CACTTCAGGC ACTAAGAGGG GCTGGACCTG	1222
GCGGCAGGAA GCCAAAGAGA CTGGGCCTAG GCCAGGAGTT CCCAAATGTG AGGGGCGAGA	1282
AACAAGACAA GCTCCTCCCT TGAGAATTCC CTGTGGATTT TTAAAACAGA TATTATTTTT	1342
ATTATTATTG TGACAAAATG TTGATAAATG G	1373

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 284 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

```

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

```

250000

65

Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu
 210 215 220

Arg Cys Leu Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro
 225 230 235 240

Gln Leu Arg Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly
 245 250 255

Ser Ser Leu Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala
 260 265 270

Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
 275 280

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sekvence DNA kódující ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru, přičemž tato sekvence v podstatě obsahuje sekvenci id. č. 1 nebo sekvenci id. č. 3.
2. Sekvence DNA, která hybridizuje alespoň s fragmentem sekvence id. č. 1 nebo sekvence id. č. 3, kterýžto fragment se skládá alespoň z 20 po sobě následujících bazí, přičemž uvedená sekvence DNA kóduje polypeptid, který je alespoň z 50% homologní s aktivním místem ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru.
3. Sekvence DNA podle nároku 1, kde sekvence obsahuje sekvenci id. č. 1 nebo sekvenci id. č. 3 s konzervativními přestavbami, substitucemi, inzercemi nebo delecemi.
4. Rekombinantní molekula DNA, která obsahuje sekvenci DNA podle nároku 1, kterážto sekvence je operativně spojena se sekvencí řídící expresi.
5. Jednobuněčný hostitel transformovaný rekombinantní molekulou DNA podle nároku 1 nebo 4.
6. Ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru, který obsahuje biologicky funkční sekvence vybrané ze sekvencí aminokyselin id. č. 2 nebo id. č. 4.
7. Způsob přípravy v podstatě čistého ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se kultivuje jednobuněčný hostitel podle nároku 5.

8. Ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru, který je v podstatě bez živočišných proteinů normálně s ním asociovaných.
9. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje terapeuticky účinné množství ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru podle nároku 6 a farmaceuticky přijatelný nosič.
10. Způsob prevence nebo zmenšení závažnosti autoimunitní choroby, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se podá terapeuticky účinného množství farmaceutického přípravku podle nároku 9.
11. Způsob prevence nebo zmenšení síly imunitní odpovědi na tkáňový štěp, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se podá terapeuticky účinného množství farmaceutického přípravku podle nároku 9.
12. Způsob stimulace imunitního systému v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání přípravku podle nároku 9.
13. Způsob potlačení imunitního systému v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství farmaceutického přípravku podle nároku 9.
14. Způsob léčení rakoviny v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje podání účinného množství farmaceutického přípravku podle nároku 9.

15. Způsob identifikace receptoru pro ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kroky, kdy se
- a) poskytne ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru nebo jeho fragment,
 - b) ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru nebo jeho fragment označí detekovatelnou značkou,
 - c) provede screening směsi pro detekci receptoru, který se váže k detekovatelně označenému ligandu příbuznému nádorovému nekrotickému faktoru podle bodu b).
16. Rozpustný fragment ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru podle nároku 6, který má podobnou biologickou aktivitu jako ligand podle nároku 6.
17. Polypeptid obsahující sekvenci aminokyselin kódovanou DNA vybranou ze skupiny, která se skládá z
- a) sekvence DNA obsahující sekvenci id. č. 1 nebo id. č. 3
 - b) sekvence DNA hybridizující se sekvencí DNA definovanou v bodě a) kódující expresi polypeptidu, který je alespoň ze 40% homologní s ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru podle nároku 12.
18. Způsob přípravy protilátkového přípravku reagujícího s ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru podle nároku 6 nebo jeho receptorem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se imunizuje organismus uvedeným ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru nebo jeho receptorem nebo jejich antigenním fragmentem.

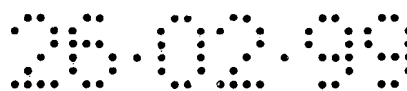
19. Farmaceutický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje protilátkový přípravek podle nároku 18.
20. Způsob exprese genu v savčí buňce v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
- a) sekvence podle nároku 1 kódující ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru zavede do buňky,
 - b) buňky ponechají žít v takových podmínkách, že uvedený gen je v savci exprimován.
21. Způsob léčení poruch souvisejících s ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru u savců v y z n a č u j í c í s e t í m, že
- a) terapeuticky účinné množství vektoru obsahujícího gen kódující ligand příbuzný nádorovému nekrotickému faktoru se zavede do buňky,
 - b) uvedený gen se exprimuje v savčí buňce.
22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že savec je člověk.
23. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený vektor je virus.
24. Způsob indukování buněčné smrti v y z n a č u j í c í s e t í m, že se podá agens schopné interferovat s vazbou ligandu příbuzného nádorovému nekrotickému faktoru podle nároku 6 na receptor.
25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se dále podá inertferon γ .

26. Způsob léčení, potlačení nebo změněny imunitní odpovědi, která zahrnuje přenos signálů mezi ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru a jeho receptorem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se podá účinné množství agens schopného interferovat s vazbou mezi ligandem příbuzným nádorovému nekrotickému faktoru a jeho receptorem.
27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená imunitní odpověď zahrnuje buňky lidského adenokarcinomu.

Srovnání proteinů příbuzných rodině TNF (TFRPs)
člověka a myši

člověk	1	MSLLDFEISA	RRLPLPRSLG	SRDGGAVRQA	QPPAPMAARR	SQRRRGRRGE	50
myš							
člověk	51	PGTALLVPLA	LGLGLALACL	GLLLAVVSLG	SRASLSAQEP	AQEELVAEED	100
myš		V	LSLGLALACL	GLLLVVVSLG	SWATLSAQEP	SQEELTAEDR	
člověk	101	QDPSELNPQT	EESQDPAPFL	NRLVRPRRSA	PKGRKTRARR	AIAAHYEVHP	150
myš		REPFELNPQT	EESQDVVPFL	EQLVRPRRSA	PKGWKARPRR	AIAAHYEVHP	
člověk	151	RPGQDGAQAG	VDGTVSGWEE	ARINSSSPLR	YNRQIGEFFIV	TRAGLYYLYC	200
myš		RPGQDGAQAG	VDGTVSGWEE	TKINSSSPLR	YDRQIGELTV	IRAGLYYLYC	
člověk	201	QVHFDEGKAV	YKLKDLLVDG	VLALRCLEEF	SATAASSLGP	QLRLCQVSGL	250
myš		QVHFDEGKAV	YKLKDLLVNG	VLALRCLEEF	SATAASSPGP	QLRLCQVSGL	
člověk	251	LALRPGSSLR	IRTLPWHLK	AAPELTYFGL	FQVH		284
myš		LPLRPGSSLR	IRTLPWHLK	AAPELTYFGL	FQVH		

Obr. 1



PV403-99
15792

hTNP SSPLAQAVRSSRTP-----A'-----A'-----
 hLT-α -----SDKPVAVHVNQAEGQ-----LQWLNK
 hLT-β -----TLKPAHLIGDPSK-QNS-----LLMRAN
 hPasL QGLGFQKLPPEEPETDLS-----PGLPAHLIGAPLKGQG-----LGWETT
 hTPRP MHTASSLEKQIGHPSPPPEKK-----ELRKVAHLTGKSNRSRMP-----LEWEDT
 hTRAIL DQDPSELNPQTEESQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRA-----RRALAAHYEVHPRPGDQAQAGVDGTV-----SGWEEA
 hCD27L FLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVQWQLRQLRUCHILRTSEETISTVQEQQONISPLVREGRQORVAAHITGRGRSNLTSSPNSKNEKALGRKINSWESS
 hCD30L NCSEDLLCILKRAPF-----WDVAELQNLNHTGPQDPR-----LYWQGG
 hCD40L FMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQ-----KSWAYLQVAKHLNKKY-----LSWNKD
 h4-1BBL PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM-----NPQLAAHVISEASSKTSV-----LQWAEK
 *****FAQLVAQNVLIDGP-----LSWYSD

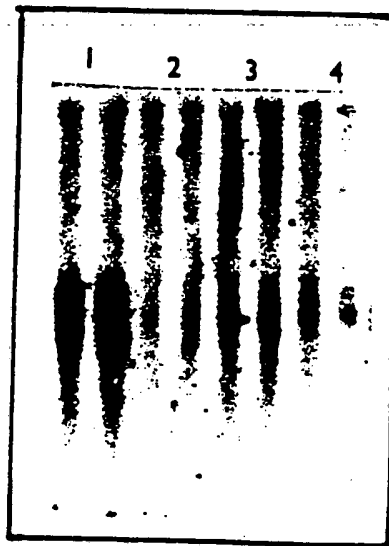
hTNP RANALLAN-GVELRD--NQ-LVVPSEGLYLIY-SQVLFKGGCPSTHVLLTHTISRIAVS-----YQTKVN--LLSAIKS-----PCQRETPEGAEAK
 hLT-α TDRAFLQD-GFSL--NNS-LLVPTSGIYFVNSQWFSKAY-SPKAT-SSPLYLAHEVQLFSSQYPPHVP--LLSSQKQ--VY-PGLQE-----
 hLT-β KEQAFLT-SGTQFSDAEG--LALPDQGLYLYTCLVGYRGRAPGGDPQGRSVTLRSSLYRAGAYGPGTPELLEGAETVTPVLDPAARRQGYG-----
 hPasL YGIVLL--SGVKYK-GG--LVINETGLYFY-SKVYFRGQSCNNQPLSHKVYFRN-----SK-----YPODL-----VMEGKQ--MSY--CTTGO-----
 hTPRP RINSSSPLRYNRQI--GE--FIVTRAGLYLY-CQVHDEGKAVYKLDLVDGVLAALRCLEEFSAATAASSLGPQLRL-----CQVSGLL
 hTRAIL RSGHSFLSNLHLRN--GE--LVIHEKGFYIY-SQTYFRFEEIKENTQNDKQMVYIYKYS-----YDPPI--LLKKSARNS-----CWSKDAEY
 hCD27L PALGRSFLHGPEL-DKGQ--LRIHRDGIYWHI-QVTLAI--CSSTASRRHPTTLAVGICSPASRSIS-----LLRLSFHQG-----CTIV-----
 hCD30L G-----ILHGVRYQD-GN--LVIQFPGLYPII-CQLQFLVQ-CPNNSVDLKLLELLINKHIKK--QALVT-----VCESGMQTKHYVQNLQFL-----
 hCD40L GYTTMSNNLVTL--ENGKQ-LTVKRQGLYIYA-QVTF--CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERI-----LLRAAN--THSSAKPCGQQSIIH-----
 h4-1BBL DGAGSSYLSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYVVFLELKLSPFTNTGHKVQGWVSLVLQAKP--QVDDFDN-----LAL-----TVELP-PCSMENKLVDRS-

hTNP P-WYEPIYLGVFQLEKGRLSAEINRPDYLDFAESGQ---VYFGIIAL
 hLT-α P-WLHSMYHGAAFQLTQGDQLSTHTDGIPLHLV--SPS--TVFFGAFAL
 hLT-β PLWYTSVGFGLVQLRRGERVYVNI SHPDMVDFAR---GKT-FFGAVMVG
 hPasL -MWARSSYLGAVFNLTSADHLVYVNSEL---SLVNFEESQT-FFGLYKL
 hTPRP ALRPGSSLRIRTLPAWHLKAAAPFL-----T-YFGLFQVH
 hTRAIL --GLYSIYQGGIFELKENDRI FVSVTNEHLIDMDHEA---S-FFGAFLVG
 hCD27L -SQRUTPLARGDTLCTNLGTLLPSR-NTDE-----T-FFGVQWVRP
 hCD30L --LDYLVNTTISVNVDTFQYIDTST-FPLE-NVL-----S-IFLYSNSD
 hCD40L -----LGGVFELOPGASVFNVTDPDSQVSHG---TGFTS-FGLLKL
 h4-1BBL --WSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTS-FGLFLVKPDNPWE

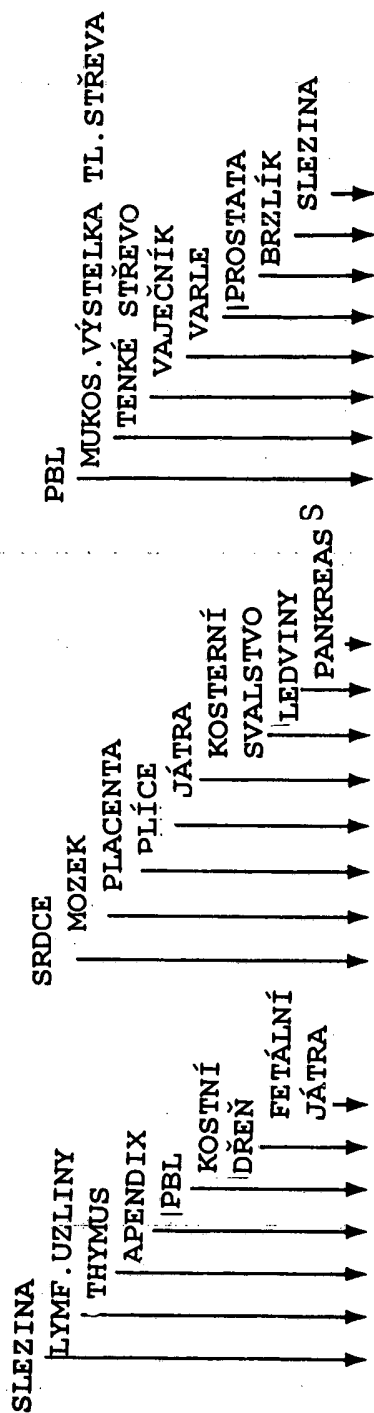
Obr. 2B

25.02.99

4/8



Obr. 3



7.5

4.4

2.4

1.35

—

—

—

—

—

— 9.5

— 7.5

— 4.4

— 2.4

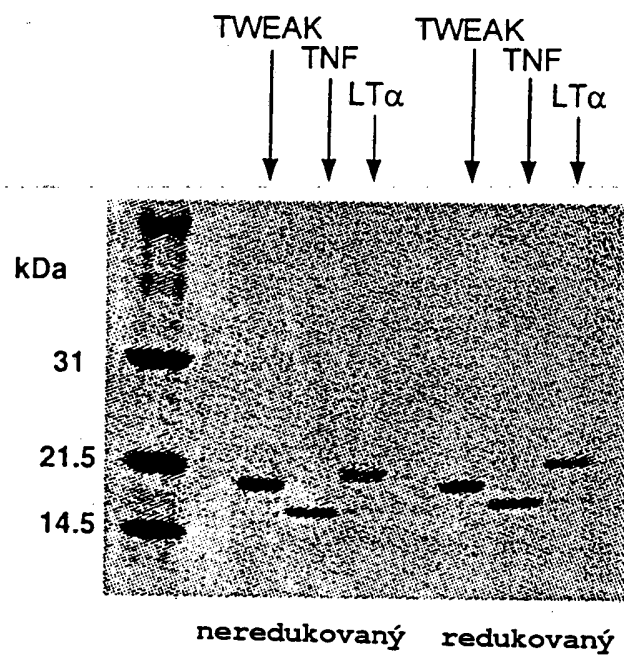
— 1.35

Obr. 4

28.02.99

25.02.99

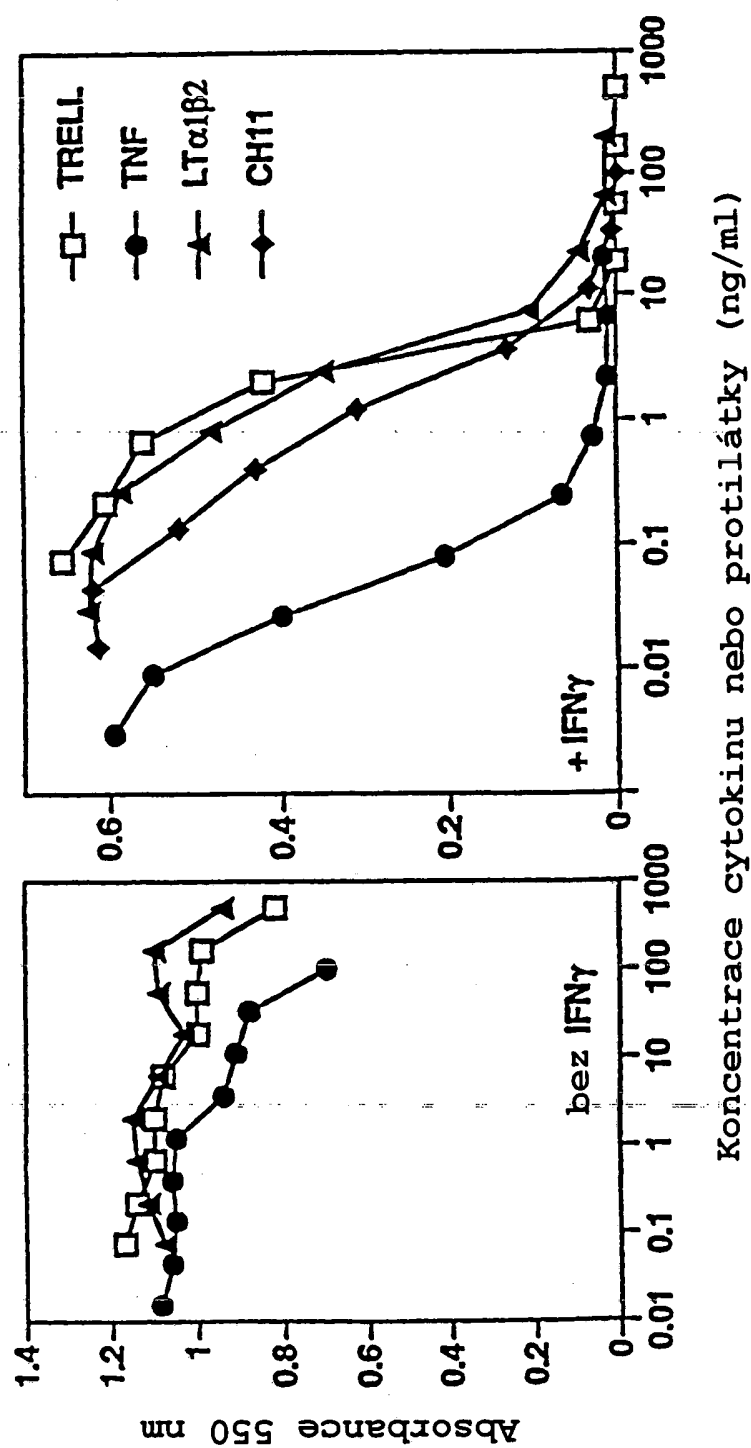
6/8



Obr. 5

28.02.99

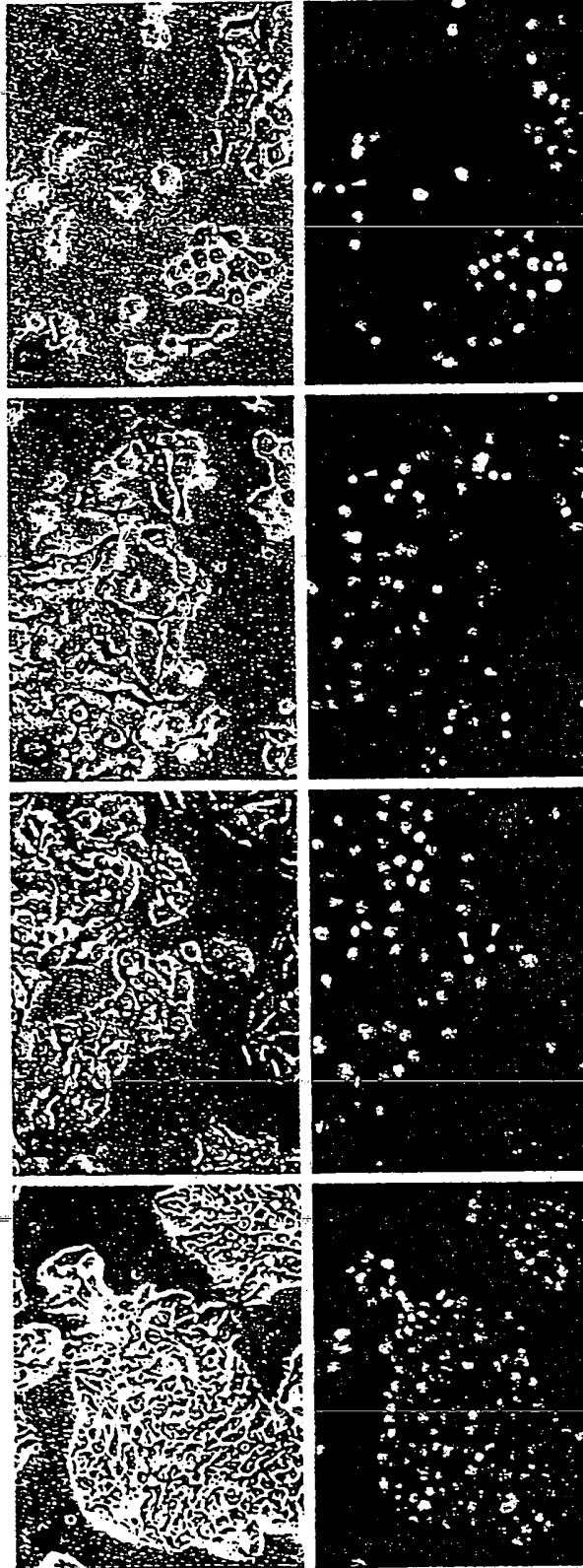
7/8



Obr. 6A

25.00.99

8/8



Obr. 6B