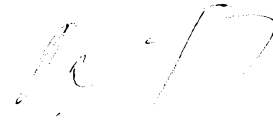


**Hisztidin-fehérjefoszfátáz**

## K I V O N A T

A találmány tárgyát képezi hisztidin-foszfátáz biológiai aktivitású, új, emlőseredetű enzim és homológ variánsai. A találmány tárgyát képezik továbbá a fehérjéket kódoló DNS-ek, a fehérjéket tartalmazó gyógyászati készítmények és a velük szemben termelt ellenanyagok.

A találmány szerinti hisztidin-foszfátáz sejtszabályozás és sejtnövekedés patológiás állapotainak diagnosztikájára alkalmazható, valamint az enzim helytelen működésével kapcsolatos patológiás rendellenességekkel kapcsolatosan adagolható gyógyászati hatóanyagként.



2002.02.13.



Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

### Hisztidin-fehérjefoszfataz

A találmány tárgyát képezi egy emlőseredetű, új enzim, a hisztidin-fehérjefoszfataz és homológ variánsai. A találmány tárgyát képezik továbbá a fehérjéket kódoló DNS-szekvenciák, a fehérjék előállítására szolgáló eljárás és a velük szembeni ellenanyagok. Előnyösen, a találmány tárgyát képezi az enzim alkalmazása diagnózisra, betegség kezelésére, agonisták és antagonisták alkalmazása hisztidin foszforilációjában szerepet játszó faktorok azonosítására, valamint a gyógyászatban feltehetőleg alkalmazható agonisták és antagonisták azonosítására.

Az új foszfataz előnyösen alkalmazható sejtszabályozás és sejtnövekedés patológias állapotainak diagnosztizálására, valamint az enzim helytelen működésével kapcsolatos patológias rendellenességekkel kapcsolatosan adagolható gyógyászati hatóanyagként.

A fehérjék foszforilációja alapvető biológiai folyamat, amely gyakran kulcsszerepet játszik a szignáltranszdukcióban és a fehérjeaktivitás szabályozásában.

Szerin, treonin és tirozin foszforilációja általánosan előfordul az eukarióta szignáltranszdukciós folyamatokban. A biokémiai eljárások irodalmában kiterjedten foglalkoznak ismeretlen fehérjékben lévő szerin, treonin és tirozin foszforilációjának kimutatásával. Például, ha emlőseredetű, tenyésztett sejteket növekedési faktorokkal, citokinekkal, hatóanyagokkal, peptidekkel vagy más, stimuláló molekulákkal, például PDGF-fel, NGF-fel, IL-2-vel, stb. kezelünk, a fehérjék szerinen, treoninon és tirozinon történő foszforilációja könnyen kimutatható a sejtek radioaktívan jelölt foszfáttal történő inkubációjával, a fehérjéknek a növekedési faktoral, stb. történő inkubációja után történő izolálásával, a fehérjéknek SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel történő elválasztásával, a gél rögzítésével, majd autoradiográfiájával a jelölt foszfátot tartalmazó fehérjesávok azonosításával. Egy másik lehetőségként a kezelt és a nem kezelt sejtekből származó fehérjék elválaszthatók egy kétdimenziós rendszer alkalmazásával, és a fehérjefoltok helyzete összehasonlítható. A kezelés eredményeként a folt látható elmozdulása a modifikációs állapotban történt változást jelzi. Egy másik eljárás szerint a fehérjéken savas hidrolízist végeznek, amelynek eredményeképpen kapott aminosavakat vékonyréteg-kromatográfiával vizsgálják a radioaktívan jelölt foszfor jelenlétére. Ezekben a fehérjekémiai eljárásokban azonban olyan körülményeket alkalmaznak, amelyeknél a foszforilált hisztidin, lizin vagy arginin nem stabil. Konkrétan, a foszforilált hisztidin (foszfohisztidin) alacsony pH-értékeknél körülbe-



lül 5-100 perces féléletidővel spontán bomlik, de semleges pH-nál a foszforilált hisztidin féléletideje napoktól hetekig terjed [Matthews, H. R., *Pharmac. Ther.* 67, 323-350 (1995)]. Elektroforézist követően a fehérje-elválasztásra alkalmazott poliakrilamid-gélt például általában savas körülmények között fixálják. Hasonló módon az aminosav hidrolízisére alkalmazott, savas körülmények a foszfohisztidin bomlásához vezetnek.

A foszforilált hisztidinről kimutatták, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik baktériumok szignáltranszdukciójában. Ezek az útvonalak a baktérium anyagcseréjét sokféle módon szabályozzák. Az ArcA/ArcB-rendszer például *E. coliban* az aerob és anaerob anyagcserét irányítja [Luchi, S., Weiner L., *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 1055-63 (1996)]. Az OmpR és az OmpF különböző ozmotikus körülményekre történő válaszreakciót irányít [Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E., Silhavy, T. J., *Mol. Microbiol.* 20, 911-7 (1996)]. A CheA és a CheZ a kemotaxisban játszik szerepet [Alon, U., *Nature* 397, 168-171 (1999)]. Ezeket a fehérjéket először genetikai eszközök segítségével azonosították: a megfelelő génben történő mutáció a kérdéses fenotípust okozza, a képződő fehérjék pedig a megfelelő gének klónozása után azonosíthatók.

Hasonló módon, mostanában megfigyelték, hogy az eukarióta *S. cerevisiae* és *Arabidopsis thaliana* szignáltranszdukciós rendszereiben olyan fehérjék játszanak szerepet, amelyekben hisztidin foszforilálódik [Loomis és mtsai., *J. Cell Science* 110, 1141-1145 (1997)]. Az Sln1-



fehérjének például van egy extracelluláris szenzordoménja, egy citoplazmás hisztidin-kináz doménja és egy aszpartát relédoménja. *Arabidopsis thaliana* mustárnövény ETR1-jét olyan mutánsokban azonosították, amelyek nem reagáltak etilénre. Az ETR1-gént azután klónozták és a fehérjét tanulmányozták, amely ahhoz a felismeréshez vezetett, hogy ez a fehérje egy hisztidin-kináz. *S. cerevisiae* és *Arabidopsis thaliana* genetikailag könnyen kezelhető rendszerek, és a hisztidin foszforilációjában szerepet játszó fehérjéiket, például az Sln1-et és az Etr1-et általában genetikai eszközökkel azonosították.

A jelenlegi technológiák általában vagy fehérjék vagy foszfoaminosavak méret szerinti elválasztását foglalják magukban.

Az N-foszforiláció emlősökben az energia-anyagcserében fontos, és különböző típusú rákbetegségben megváltozik. Az Nm23-fehérje például egy nukleozid-difoszfát-kináz, amely a glikolízis és az oxidatív foszforiláció által előállított ATP-t használja fel, és a nukleozid- és dezoxinukleozid-difoszfátokat trifoszfátokká alakítja. Az Nm23 átmenetileg a 118. hisztidinen foszforilálódik "ping-pong" reakciómechanizmus részeként. Az Nm23 a foszfátcsoportját az ATP-citrát-liázban és a szukcinil-CoA-szintetázban lévő hisztidin aminosavakra is képes átvinni. A hisztidin foszforilációja fontos szerepet játszik a sejtek energiaanyagcseréjében.



Emberben sokféle Nm23-fehérje van. Előrehaladott metasztatikus rákban ezek az Nm23-fehérjék gyakran alacsony szinten expresszálódnak. Ezen eredmények alapján az Nm23 feltehetőleg antionkogén. Ezen kívül egyes rákbetegségeknél mutációk találhatók bizonyos Nm23-fehérjékben. Ezek a mutációk gyakran az Nm23 foszforilációjának vagy defoszforilációjának sebességére hatnak.

Összefoglalva, ezek az eredmények azt mutatják, hogy az N-foszforiláció fontos szerepet játszik az energiaanyagcserében és a rákban. Az N-foszforilációt vagy az N-defoszforilációt befolyásoló fehérjék vagy hatóanyagok fontosak lehetnek rák vagy olyan anyagcsere-rendellenességek kezelésében, mint például elhízás, étvágytalanság, rák, HIV vagy más betegségek miatti sorvadás, stb. Mivel N-foszforiláció más szervezetekben biológiai jelenségek széles körében fordul elő, lehet, hogy az N-foszforiláció más, emlőseredetű betegségeken és rendellenességeken is szerepet játszik, mint például immunbetegségek, víruseredetű fertőzések, genetikai rendellenességek, szívbetegségek, stb.

Sajnos az emlősök sokkal lassabban fejlődnek, mint a baktériumok, *S. cerevisiae* és *Arabidopsis thaliana*, ezért ezen egyszerűbb szervezeteknél használt genetikai megközelítések nehezen alkalmazhatók hisztidin, lizin vagy arginin foszforilációjában szerepet játszó fehérjék azonosítására. Továbbá, azok a biokémiai technológiák, amelyekkel a szerinen, treoninon és tirozinon foszforilált fehérjék azonosíthatók, általában nem alkalmazhatók hisztidinen, li-



zinen és argininen foszforilált fehérjék azonosítására. A technika állása szerint szükség van tehát N-foszforiláció vizsgálatára alkalmazható technológiákra és biokémiai reagensekre.

A hisztidin-foszfatazok és a hisztidin-kinázok ellentétesen ható enzimek. A hisztidin-kináz fehérjékben lévő, bizonyos hisztidin aminosavak foszforilálását végzi, míg a hisztidin-foszfatazok ezt a foszforilációt alakítják vissza. Mindkét enzim valószínűleg fontos szerepet játszik a szignáltranszdukcióban, az apoptózisban, a sejtnövekedés ellenőrzésében és a sejtdifferenciációban. Ezekről az enzimekről ismeretes, hogy ezeknek a sejtes működéseknek megzavarásával okoznak betegséget. A találmány szerinti megoldás kidolgozásával célunk volt tehát a patofiziológiai zavarok okainak vizsgálatára alkalmazható anyagok előállítása és adott esetben e zavarok kezelése.

A hormonok és peptidek serkentik a sejteken a sejt-felszíni receptorokat, és a szignáltranszdukciós útvonalon keresztül sejtes hatásokat váltanak ki. Bizonyos fehérjeszubsztrátok szabályozó fehérje-kinázokon és - foszfatazokon keresztül történő reverzibilis foszforilációja alapvető szerepet játszik az intracelluláris szignálátvitelben. Receptorhoz kötött, membránhoz kötött és intracelluláris fehérje-kinázok és - foszfatazok szabályozzák a sejtszaporodás, a sejtdifferenciáció és az immunrendszer folyamatait. Ezeknek a szabályozóknak vagy aktivitásuknak a helytelen működése lényeges szerepet játszik nagyszámú patofiziológias hatásnál. Ezek szerint a fehérje-kinázok és



-foszfatázok és a szignáltranszdukciós útvonal, amelyben szerepet játszanak, hatóanyag-felismerési folyamat lehetséges célpontjai.

Emlősökben a szignáltranszdukció Ser/Thr/Tyr reverzibilis foszforilációját érinti. A hisztidin-foszfátról ismert, hogy emlősökben megtalálható [Crovello, C. S., Furie, B. C., Furie, B., Cell 82, 279-286 (1995)], azonban eddig még nem azonosították sem a megfelelő kinázokat, sem a foszfatázokat. Nehézséget többek között az okoz, hogy a hisztidin-foszfát instabil ahhoz, hogy hidrolizálható legyen, és a hagyományos, foszfortartalmú aminosavak vizsgálatára szolgáló módszerekkel nem mutatható ki.

Baktériumokban a His-kinázok és His-foszfatázok működését alaposan tanulmányozták. A kemotaxisban és adaptációban való részvételük ígéretes támadási pontot nyújt bakteriális betegségek esetében.

A következőkben összefoglaljuk a találmányt.

A találmány tárgyát képezi hisztidin-fehérjefoszfatáz, előnyösen hisztidin-fehérjefoszfatáz-polipeptidek és hisztidin-fehérjefoszfatáz-polinukleotidok és előállításukra szolgáló rekombináns anyagok és eljárások. Ilyen polipeptidek és polinukleotidok bizonyos betegségek, például, de nem kizárólag rák és anyagcsere-rendellenességek, kardiovaszkuláris betegségek és központi idegrendszeri betegségek - a leírásban a továbbiakban "találmány szerinti betegségek" kifejezést alkalmazzuk - kezelésére szolgáló eljárásokkal kapcsolatban lehetnek érdekesek.



Egy további szempont szerint a találmány tárgyát képezik agonisták és antagonisták (pl. inhibitorok) azonosítására szolgáló eljárások a találmány szerinti anyagok alkalmazásával, és N-foszforiláció kiegyensúlyozatlanságával kapcsolatos körülmények kezelése az azonosított vegyületekkel. Egy további szempont szerint a találmány tárgyát képezik diagnosztikus vizsgálatok nem megfelelő hisztidin-fehérjefoszfataz-aktivitással vagy -szinttel kapcsolatos betegségek kimutatására.

A találmány tárgyát képezik a megfelelő variánsok és mutánsok, amelyek például véletlenszerű vagy ellenőrzött szubsztitúcióval, eltérő kivágódással, egy vagy több nukleotid vagy aminosav deléciójával vagy addíciójával állíthatók elő a biológiai aktivitás alapvető megmaradása mellett.

A találmány tárgyát képezi tehát hisztidin-foszfataz biológiai aktivitású polipeptid, amely erősen specifikus foszfohisztidinre, molekulatömege 13000-15000, és amely emlőseredetű szövetből tisztítható legalább egy anioncserélő kromatográfiás, gélszűrési és affinitáskromatográfiás lépéssel. Az emlőseredetű szövet előnyösen szívből, veséből, májból, hasnyálmirigyből, izomszövetből és heréből származik. Az emlős előnyösen ember, nyúl, patkány.

A találmány szerinti polipeptid legalább a következő aminosavszekvencia-motívumot (3. azonosítószámú szekvencia) tartalmazza: DCECLGGGRISHQSQD



A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a polipeptid legalább a következő aminosavszekvencia-motívumot (4. azonosítószámú szekvencia) tartalmazza:

DCECLGGGRISHQSQDX<sup>1</sup>KIHVYGYSMX<sup>2</sup>YGX<sup>3</sup>AQH

ahol X<sup>1</sup> jelentése K vagy R, X<sup>2</sup> jelentése A vagy G és X<sup>3</sup> jelentése P vagy R.

A találmány egy további megvalósítási módja szerint a polipeptid legalább a következő aminosavszekvencia-motívumot (5. azonosítószámú szekvencia) tartalmazza.

YHADIYDKVSGDMQKQGCDCCECLGGGRISHQSQDKKIHVYGYSM.

Mindezen részleges szekvenciák erősen konzervatívak a teljes enzim aminosavszekvenciáján belül, és feltehetőleg az enzim aktív helyében találhatóak, vagy más biológiai vagy gyógyászati jelentőséggel bírnak emlősökben.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a polipeptidnek hisztidin-foszfataz biológiai aktivitása van, amely erősen specifikus foszfohisztidinre és a molekula-tömege 13000-15000, és a következő aminosavszekvenciát tartalmazza (2. azonosítószámú szekvencia):

(M)AVADLALIPDVIDSDGVFKYVLIRVHSAPRSGAPAAESKEIVRGYKWA EYHADIYDKVSGD  
MQKQGCDCCECLGGGRISHQSQDKKIHVYGYSMAYGPAQHAISTEKIKAKYPDYEVTWANDGY

A találmányi leírásban feltárjuk a szekvenciák homológ variánsait is. A találmány egy további tárgyát képezi tehát hisztidin-foszfataz biológiai aktivitású polipeptid, amely erősen specifikus foszfohisztidinre, a molekulatömege 13000-15000, amelynek aminosavszekvenciája 64-99%-ban, elő-



nyösen 75-99%-ban homológ az előzőekben ismertetett szekvenciával. Mint az alábbiakban bemutatjuk, a találmányban kitanítást adunk sok más, homológ polipeptidre, amelyek mindegyikének hisztidin-fehérjefoszfataz biológiai aktivitása van.

A találmány egy további tárgyát képezik az előzőekben ismertetett és az alábbiakban ismertetendő polipeptideket kódoló DNS-szekvenciák. Előnyösen a találmány tárgyát képezi a következő nukleotidszekvenciát (1. azonosítószámú szekvencia) tartalmazó DNS:

```
(ATG) GCGGTGGCGGACCTCGCTCTCATTCTGATGTGGACATCGACTCCGACGGCGTCTTCAAG  
TATGTGCTGATCCGAGTCCACTCGGCTCCCCGCTCCGGGGCTCCGGCTGCAGAGAGCAAGGAGAT  
CGTGCGCGGCTACAAGTGGGCTGAGTACCATGCGGACATCTACGACAAAGTGTGGGGCGACATGC  
AGAAGCAAGGCTGCGACTGTGAGTGTCTGGGCGGGCGCATCTCCACCAGAGTCAGGACAAG  
AAGATTCACGTGTACGGCTATTCCATGGCCTATGGTCCTGCCAGCACGCCATTTCAACTGAGAA  
AATCAAAGCCAAGTACCCCGACTACGAGGTCACCTGGGCTAACGACGGCTAC
```

A találmány tárgyát képezik továbbá az ellenanyagok, előnyösen monoklonális ellenanyagok, amelyek a találmány szerinti polipeptidekkel szemben termelődnek.

Végül a találmány tárgyát képezi a gyógyászati készítmény, amely az előzőekben és az alábbiakban ismertetett polipeptideket tartalmazza adott esetben megfelelő kötőanyagokkal, hordozókkal vagy más, aktív alkotórészekkel együtt.



A következőkben részletesen ismertetjük a találmányt.

#### (A) Izolálás és tisztítás

A hisztidin-fehérjefoszfátot nyúlmájából izoláltuk. A májkészítményt körülbelül 110 g, apró darabokra vágott anyagból kiindulva készítjük. Homogenizációs pufferrel keverjük (220 ml 30 mM trietanolamin/hidroklórsav pH 7,5, 1 mM etiléndiamintetraecetsav, 300 mM szacharóz, 0,1 mM benzamidin, 0,1% 2-merkaptoetanol), majd homogenizátorban jégen történő hűtés közben szétzúzzuk. Az első centrifugálás után (10 perc, 3800 g, 4°C) a felülúszót újra centrifugáljuk (1 óra, 48000 g, 4°C). Ezt a felülúszót gézen keresztülszűrjük, és körülbelül 20 ml-es mennyiségekben, -80°C-on lefagyasztjuk.

#### Oszlopkromatográfiás elválasztási eljárások

A hisztidin-foszfátot három tisztítási lépésben izoláltuk (1. ábra).

##### 1. Anioncserélő kromatográfia

A nyers májkivonatot még egyszer centrifugáljuk (30 perc, 48000 g). A felülúszót A-pufferrel ekvilibrált (20 mM trietanolamin/hidroklórsav pH 8,0, 1 mM etiléndiamintetraecetsav, 0,1% 2-merkaptoetanol, 0,02% nátrium-nitrit) Source Q30 oszlopra (Pharmacia, Freiburg) öntjük. Az elúciót 200 mM, A-pufferben lévő nátrium-klorid-oldattal végezzük 1 ml/min folyási sebességgel.

##### 2. Gélszűrés

Az aktív frakcióhoz (lásd aktivitásmeghatározás) kevertetés és hűtés közben szilárd ammónium-szulfátot adunk (11,2 g 17 ml-hez). A centrifugálással kapott üledéket (20



perc, 48000 g, 4°C) A-pufferben szuszpendáljuk és *Sephadex 75 26/60* 1,6x60 cm-es oszlopra (Pharmacia, Freiburg) töltjük. A gélszűrés 50 mM A-pufferben lévő nátrium-klorid hozzáadásával történik 1 ml/min sebességnél.

### 3. Affinitáskromatográfia

A gélszűrésből származó aktív frakciót 1:3 arányban hígítjuk B-pufferrel (20 mM trietanolamin/hidroklórsav pH 8,0, 0,1 mM etiléndiamintetraecetsav, 0,1% 2-merkaptoetanol, 0,02% nátrium-nitrit) és 10 mM-ra állítjuk magnézium-kloridban. A mintát *Blue Sepharose 6 25x510* mm oszlopra (Pharmacia, Freiburg) töltjük. Az elúció 200 mM nátrium-kloridot tartalmazó B-puffer alkalmazásával történik 1 ml/min folyási sebességgel.

#### (B) Specifikus aktivitás meghatározása

Az oldható hisztidin-foszfátáz aktivitását szubsztrátként  $^{32}\text{P}$ -tal jelölt, hisztidinen foszforilált fehérje (CheA) defoszforilációjával határozzuk meg. A CheA rekombináns, bakteriális hisztidin-autokináz [Bilwes, A. M., Alex L. A., Crane B. R., Simon M. I., *Cell* 96, 131-141 (1999)], a C-terminális kinázdomén foszforilálja az N-terminális His48-at. A reakcióban szabad foszfát képződik, amelyet vékonyréteg-kromatográfiával azonosítunk (poli-etilénimin-cellulóz lemezek, 0,5 M lítium-klorid mozgó fázisként). A kimutatás egyrészt ammónium-molibdenáttal, másrészt autoradiográfiával történik (2. ábra). Más fehérjékre foszfátátvitel nem történt, sem pedig a szubsztrát nem hasadt peptidfragmensekre. A termék foszfát, azaz egy foszfohisztidin fehérjefoszfátáz vett részt a reakcióban.



A tisztított fehérje a  $^{32}\text{P}$ -foszforilált CheA hisztidinjének idő-, hőmérséklet-, pH- és fehérjefüggő defoszforilálását mutatja (3. ábra).

#### Stabilitás

A tisztított fehérje a nyers homogenátumban és a részlegesen tisztított frakciókban stabilnak mutatkozott tárolás közben.

#### Enzimvizsgálat

Szubsztrát készítése: ( $^{32}\text{P}$ -jelölt CheA)

A rekombináns CheA-t (5  $\mu\text{l}$ ) 0,5  $\mu\text{l}$ , dimetil-szulfoxidban oldott 100 mM fenilmetilszulfonil-fluoriddal és 5  $\mu\text{l}$  500 mM HEPES-sel pH 8,0 és 1 mM magnézium-kloriddal összekeverjük. A jelölt,  $^{32}\text{P}$ -g-adenozin-trifoszfát (108  $\mu\text{Curie}$ ), 5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  adenozin-trifoszfát és 50  $\mu\text{l}$  víz hozzáadását követően 37°C-on 3 órán keresztül inkubáljuk.

#### Aktivitätsmeghatározás

A szubsztrátot (10  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -CheA) 10  $\mu\text{l}$  vizsgálati pufferrel (100 mM trietanolamin/hidroklorosav pH 8,0, 0,1% 2-merkaptoetanol, 0,02% nátrium-nitrit) és az enzimoldattal keverjük. A reakciót 37°C-on 30 percen keresztül végezzük. Ezután 2  $\mu\text{l}$  500 mM etilén-diamin-tetraecetsavat és 126  $\mu\text{l}$  1:1 arányú metanol/acetont adunk hozzá. Centrifugálást követően (5 perc, 15800 g) a felülúszót eltávolítjuk, és szcintillációs számlálóban mérjük.



Az ismertetett foszfatáz más fehérjefoszfatázoktól a következőképpen különíthető el:

1) a foszfohisztidin felé történő specifitása alapján (1. táblázat), a hisztidin-foszfatáz nem hidrolizálja például a p-nitrofenil-foszfátot,

2) az aktivitás nem gátolható okadasavval vagy vanadáttal (2. táblázat),

3) a molekulatömeg számottevően kisebb.

1. táblázat

Az új hisztidin-fehérjefoszfatázzal történő hidrolízis

Azocoll	-
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	-
p-nitrofenil-foszfát	-
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Ser/Thr-kazein}$	-
Tyr-xxx	-
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{His-nukleozid-difoszfát-kináz}$	-
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{His-cheA}$	+



## 2. táblázat

A hisztidin-foszfátáz-aktivitást befolyásoló reagensek

Reagens	Koncentráció	Aktivitás(%)
Foszfát	10 mM	0
Okadasav	10 $\mu$ M	108
Mikrocisztin	5 nM	110
Tautomycin	0,5 nM	90
Gátló fehérje I <sub>1</sub>	1 nM	120
Molibdenát	10 $\mu$ M	71
Vanadát	10 $\mu$ M	62
Fluorid	5 mM	105
EDTA	5 mM	108
EGTA	5 mM	91
Mg <sup>2+</sup>	1 mM	142
Mg <sup>2+</sup>	10 mM	226
Ca <sup>2+</sup>	1 mM	165
Ca <sup>2+</sup>	10 mM	240

$$100\% = \text{xxx nmol/min} \times \text{mg}^{-1}$$

(C) Hisztidin-fehérjefoszfátáz jellemzése

A tisztított fehérje SDS-gélelektroforézis-vizsgálat szerint egy meghatározott, 14000 látszólagos molekulatömegű sávot tartalmazott (4. ábra). A tömegvizsgálat egy 13768 molekulatömegű fehérjét azonosított (5. ábra). A hisztidin-fehérjefoszfátáz N-terminálisan egy acetylcsoporttal blokkoljuk. Szekvenciainformáció Edman-degradációval nem elérhető, és a fehérje jellemzéséhez proteolitikus hasítás szükséges.



#### (D) Fehérje analitikai meghatározása

Az aktív frakción (4. ábra) enzimes hasítást végeztünk az aminosavszekvencia meghatározása érdekében, és a képződő peptidfragmenseket Edman-degradációval és tömegspektrográfiával szekvenáltuk a hagyományos technológiákkal [lásd, Kellner, R., Lottspeich F., Meyer H. E. Microcharacterization of Proteins, Wiley-VCH (1999)]

#### Enzimes fragmentálás

A gélsávot szikével kivágtuk és Eppendorf-csőbe vittük át. Az enzimes fragmentálást proteázként tripszin hozzáadásával végeztük (1 µg tripszin, 100 µl 0,5 M ammóniumbikarbonát, 37°C, 12 óra). A képződő peptidfragmenseket kivontuk (50% trifluorecetsav, 50% acetonitril). A kivonatot vákuum koncentrátorban koncentráltuk.

#### A peptidfragmensek kromatográfiás elválasztása

A peptidfragmenseket A-eluensben oldottuk (0,1% trifluorecetsav vízben) és fordított fázisú kromatográfiás elválasztáshoz alkalmaztuk (B-eluens: 20% 0,1% trifluorecetsav vízben, 80% acetonitril). Az UV-meghatározáson (214 nm) alapuló frakcionálást követően az elválasztott peptidfragmenseket Edman-szekvenálással és tömegspektrográfiával határoztuk meg.

#### Edman-szekvenálás és tömegspektrográfiás meghatározás

A kromatográfiás elválasztás után a folyékony frakciók 90%-át alkalmaztuk Edman-szekvenáláshoz (hagyományos körülmények, a készülék: 494 modell, PE-Applied Biosystems, Weiterstadt). A frakció fennmaradó részét tömegvizsgálatra



alkalmaztuk (MALDI-MS), (készülék: Voyager STR, Perseptive Biosystems, Wiesbaden).

Azonosított peptidszekvenciák

A következő peptidszekvenciákat azonosítottuk (nyúl):

AAAGLAQIPD VDIDSDGVFK

YVLIR

VHAAPRSEAPGGESK

DIVR

WAEYHADIYDK

VSGELQK

ISHQSQDR

KIHVYGYSMGYGR

YPDYEVTWADDGY

Ezek a peptidek a következő, nyúlból származó enzim-peptidet adják (6. azonosítószámú szekvencia):

AAAGLAQIPD VDIDSDGVFK YVLIR VHAAPPSEAPGGESK DIVR GYK WAEYHADIYDK VSGELQK  
K GHDCECLGGGRISHQSQDR KIHVYGYSMGYGRAQHSVSTEKIRAKYPDYEVTWADDGY

(E) Nukleotidszekvenálás

Nyúleredetű DNS-könyvtárat vizsgáltunk hisztidin-fehérjefoszfátáz nukleotidszekvenciára a megszerzett aminosavszekvenciából kiválasztott láncindítókkal. Klónozással és szekvenálással azonosítottuk a 7a ábrában közzétett nukleotidszekvenciát.



A hisztidin-fehérjefoszfátáz fehérjeszekvenciájába fordítható 327 bázis a 11. helyzettől a 119.-ig tart (7b ábra).

#### Adatbázis-vizsgálat

Az adatbázis-keresést BLAST-algoritmussal végeztük. Homológ fehérjék azonosíthatók a fehérje-adatbázisokban lévő *C. elegans*ból, *Drosophila melanogaster*ből, *Drosophila pseudoobscurá*ból.

A nukleotid-adatbázisokban EST-eket (expresszált szekvenciacímkeket) azonosítottunk emberben, patkányban és egérben. A humán eredetű homológot eddig még nem publikálták. Ezen EST-alkotók alapján a humán eredetű hisztidin-fehérjefoszfátáz fehérjeszekvenciája a következő (2. azonosítószámú szekvencia a metionin nélkül):

AVADLALIPDVIDIDSDGVFKYVLIRVHSAPRSGAPAAESKEIVRGYKWA EYHADIYDKVSGDMQK  
QGCDCECLGGGRISHQSQDKKIHVYGYSMAYGPAQHAISTEKIKAKYPDYEVTWANDGY

A patkány eredetű homológot még nem publikálták. Ezen EST-alkotók alapján a patkány eredetű hisztidin-fehérjefoszfátáz fehérjeszekvenciája a következő (7. azonosítószámú szekvencia):

NGLNTRGKGS SPLGKDHQELELLTPYPAVKFSVGPTRATRAYPEATLPTSADIYDKVSGELOKN  
GYDCECLGGGRISHQSQDRKIHVYGYSMGYGRAQHSVSTEKIKAKYPDYEVTWADDGY



Az egéreredetű homológot még nem publikálták. Ezen EST-alkotók alapján az egéreredetű hisztidin-fehérjefoszfataz fehérjeszekvenciája a következő (8. azonosítószámú szekvencia):

MAADLGQIPDVIDSDGVFKYVLIRVHLAEPSPGPAKECKEIVRGYKWA EYHADIYDKVSGELQR  
 NGYDCECLGGGRISHQSQDRKIHVYGYSMGYGRAQHSVSTEKIKAKYPDYEVTWADDGY

3. táblázat

Különböző fajokból származó hisztidin-foszfataz fehérjék szekvenciahomológiája százalékos azonosságban kifejezve

	1	2	3	4	5	6	7
1 humán	100	84,0	65,3	64,3	68,2	38,0	40,3
2 nyúl		100	72,4	71,4	71,0	36,0	42,0
3 egér			100	67,3	52,7	32,7	33,3
4 patkány				100	51,6	30,8	29,5
5 zebrahal					100	33,7	42,1
6 <i>C. elegans</i>						100	39,7
7 <i>Drosophila</i>							100

(E) Fehérjelokalizáció és szöveti eloszlás

A humán eredetű hisztidin-fehérjefoszfataz gént a 9. kromoszómára lokalizáltuk (9q33-Tel, marker sts-N90764, szünet D9S159-qTEL).



A cDNS-ek expressziójára alkalmazott források:

Agy, mell, központi idegrendszer, vastagbél, fityma, csírasejt, szív, vese, máj, tüdő, izom, hasnyálmirigy, mellékpajzsmirigy, egyesített biológiai minták, prosztata, lép, here, pajzsmirigy, mandula, méh, teljes embrió.

A hisztidin-fehérjefoszfataz mRNS-e eloszlásának vizsgálatával fokozott szintet tapasztaltunk normál szövetekben, mint például szív, vese, máj, hasnyálmirigy, vázizom és here (9a, b ábra).

#### (F) Hisztidin-foszfataz ellenanyagok

Hisztidin-foszfataz ellenanyagokat termeltettünk a fehérje három különböző szakaszával, nevezetesen a molekula N-terminális, középső és C-terminális részével szemben. Erre a célra három peptidszekvenciát választottunk:

1. peptid - QIPDVDIDSD GVFKYV (16aa, 9. azonosítószámú szekvencia)
2. peptid - CLGGGRISHQ SQDK (14aa, 10. azonosítószámú szekvencia)
3. peptid - CTEKIKAKYP DYEY (14aa, 11. azonosítószámú szekvencia)

A peptideket hagyományos FMOC-kémiával szintetizáltuk. Az immunizáláshoz mindegyik peptidet két nyúlba injektáltuk (4 injektálás) és négy vérmintát vettünk. Az utolsó véreztetés körülbelül 3 hónap múlva történt. Az előállított ellenanyagok hisztidin-foszfataz kimutatására és lokalizálására alkalmazhatók.



A molekulán belül a különböző szakaszok egyedileg vizsgálhatók. Különösen a hisztidin-foszfataz erősen konzervatív, központi részéről, amely a következő aminosavszekvenciát tartalmazza: DCECLGGGRISHQSQD (3. azonosítószámú szekvencia), feltételezhető, hogy a fehérjék *in vivo* működéséért felelős aktív helyet tartalmazza. Az ezzel a szakasszal szembeni ellenanyag gátló vagy semlegesítő alkalmazásra megfelelő.

A hisztidin-fehérjefoszfataz jellemzői a következőkben foglalhatók össze:

1. A humáneredetű hisztidin-fehérjefoszfataz aminosavszekvenciája körülbelül 124 aminosavból áll.

2. A hisztidin-fehérjefoszfataz aminosavszekvenciája a C-terminális részén erősen homológ, de csak gyengén homológ az N-terminális részen.

3. A molekulatömeg  $13800 \pm 100$  (5. ábra).

4. A hisztidin-fehérjefoszfataz N-terminális vége acetilálással blokkolt.

#### Gyógyászati készítmények

A natív, valamint a rekombináns fehérjék gyógyszerként alkalmazhatók, amelyek közvetlenül vagy gyógyászati készítményekben adhatók a betegeknek. A találmány egy további szempontját képezik tehát a gyógyszerként alkalmazható, rekombináns vagy natív fehérjék, amint ezt az előzőekben és a következőkben ismertettük, és a fehérjét és gyógyászatilag elfogadható hígítószeret, hordozót vagy kötőanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény.



A találmány szerinti gyógyászati készítmények további, nagyon különböző, aktív, gyógyászati vegyületeket is tartalmazhatnak.

A leírás szerinti értelemben a "gyógyászatiilag elfogadható hordozó" kifejezésen olyan inert, nem toxikus, szilárd vagy folyékony töltőanyagot, hígítószeret vagy kapszulázó anyagot értünk, amely nem reagál kedvezőtlenül az aktív vegyülettel vagy a betegre nem ártalmas. Alkalmos, előnyös, folyékony hordozók a technika állása szerint jól ismertek, például a steril víz, a sóoldat, a vizes dextróz, a cukoroldatok, az etanol, a glikolok és olajok, beleértve a petróleum, az állati, a növényi vagy a szintetikus eredetűeket, például mogyoróolaj, szójaolaj és ásványi olaj.

A találmány szerinti kiszerezések egységnyi dózisban adagolhatók, amelyek hagyományos, nem toxikus, gyógyászatiilag elfogadható hordozókat, hígítókat, adjuvánsokat és jellemzően parenterális adagoláshoz való hordozókat tartalmaznak.

A leírás szerinti értelemben a "parenterális" kifejezésen szubkután, intravénás, intraartikuláris és intratracheális injekciót vagy infúziós technológiákat értünk. Egyéb adagolási módok, például orális adagolás vagy helyi alkalmazás szintén megfelelő. Parenterális készítmények és összetételek legelőnyösebben intravénásan adagolhatók akár kapszula formában, akár állandó fúzióként az ismert módszerek szerint. Orális adagolásra szolgáló tabletták és kapszulák hagyományos kötőanyagokat tartalmaznak, például kötőanyagokat, töltőanyagokat, hígítószereket, tablettázó



anyagokat, síkosító anyagokat, dezintegráló anyagokat és nedvesítő anyagokat. A tabletták a technika állása szerinti eljárásokkal boríthatók. Orális adagolású, folyékony készítmények vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, szirupok vagy elixírek formájában készülhetnek, vagy szárított termék formájában lehetnek, amely vízzel vagy más, megfelelő hordozóval alkalmazás előtt feloldható. Ilyen folyékony készítmények hagyományos adalékanyagokat is tartalmazhatnak, például szuszpendáló anyagokat, emulzióképző anyagokat, nem vizes hordozókat és tartósítószerket. Helyi alkalmazáshoz vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, zselék vagy előnyösen emulziós kenőcsök formájában alkalmazhatók. A találmány szerinti egységnyi dózisosok a találmány szerinti fehérje napi szükséges adagját tartalmazhatják, vagy ennek alegységeit többszöri adagban, amely együttesen a kívánt adagot adja. A gyógyászatilag elfogadható adag és az adagolási ráta optimuma egy adott betegnél (emlősök, például ember) sok tényezőtől függ, például az alkalmazott, konkrét, aktív anyagtól, a kortól, a testtömegtől, az általános egészségi állapottól, a nemtől, a táplálkozástól, az adagolás idejétől és módjától, a kiválasztás („clearance”) sebességétől, az enzimaktivitástól (egység/mg fehérje), a kezelés tárgyától, azaz terápia vagy megelőzés, és a kezelendő betegség természetétől.

A találmány szerinti fehérje gyógyászatilag hatékony napi dózisa a készítményekben és összetételekben a kezelendő betegben (*in vivo*) körülbelül 0,01 és 100 mg/kg testtömeg (100 kU/mg specifikus aktivitás alapján), előnyösen 0,1



és 10 mg/kg testtömeg között van. Az adagolási forma szerint egyetlen adag például 0,5 és 10 mg hisztidin-fehérjefoszfátot tartalmazhat.

A következőkben röviden ismertetjük az ábrák leírását.

1. ábra: Hisztidin-foszfát izolálására alkalmazott tisztítási módszer vázlata.

2. ábra: Szervetlen foszfát azonosítása hisztidin-foszfát hasításának reakciótermékeként. A lemezeken vékonyréteg-kromatográfiát mutatunk be (PEI-cellulóz, 0,8 M LiCl), bal kép: ammónium-molibdenát kezelés, jobb kép: autoradiográfiás kezelés, 1: [<sup>32</sup>P]his-cheA, 2: reakciótermék, 3: ATP, 1-3: foszfát (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

3. ábra: A cheA-szubsztrát idő- és fehérjefüggő defoszforilációja, bal kép: bomlás 0, 20 és 40 perc múlva, jobb kép: különböző mennyiségű szubsztrátból (x-tengely: ng fehérje) radioaktívan jelölt foszfát felszabadulása (bal y-tengely: %, jobb y-tengely: radioaktivitás).

4. ábra: Frakciók vizsgálata aktív hisztidin-foszfáttal (SDS-PAGE), AF: aktív frakció; 1,2: BSA (1 µg, 0,5 µg); 3: AF; 4,5: molekulamarkerek.

5. ábra: Hisztidin-foszfát tömegspektrometriás vizsgálata. Y-tengely: beütésszám, x-tengely: tömeg (m/z).

6. ábra: Hisztidin-foszfát fordított fázisú kromatográfiás elválasztása enzimes fragmentálás után, A-eluens: 0,1% trifluorecetsav vízben és B-eluens: 20% 0,1%



trifluorecetsav vízben, 80% acetonitril, UV meghatározás  
214 nm.

7a ábra: (részleges) Nyúleredetű hisztidin-fehérje-  
foszfátáz nukleotidszekvenciája.

7b ábra: Nyúleredetű hisztidin-fehérjefoszfátáz  
transzlatált teljes aminosavszekvenciája.

8a ábra: Hisztidin-fehérjefoszfátáz eloszlása tumoros  
sejtvonalban.

8b ábra: Hisztidin-fehérjefoszfátáz szöveti eloszlása  
tumorszövetben.

8c ábra: Hisztidin-fehérjefoszfátáz szöveti eloszlása  
normál szövetben.



SZEKVENCIALISTA

- (210) 1
- (211) 375
- (212) DNS
- (213) Homo sapiens

- (220)
- (221) cds
- (222) (1) ... (375)
- (223) Humán hisztidin-proteinfoszfatóz
- (400) 1

```

atg gcg gtg gcg gac ctc gct ctc att cct gat gtg gac atc gac tcc 48
Met Ala Val Ala Asp Leu Ala Leu Ile Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser
  1           5           10           15
gac ggc gtc ttc aag tat gtg ctg atc cga gct cac tcg gct ccc cgc 96
Asp Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile Arg Val His Ser Ala Pro Arg
           20           25           30
tcc ggg gct ccg gct gca gag agc aag gag atc gtg cgc ggc tac aag 144
Ser Gly Ala Pro Ala Ala Glu Ser Lys Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys
           35           40           45
tgg gct gag tac cat gcg gac atc tac gac aaa gtg tcg ggc gac atg 192
Trp Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Asp Met
           50           55           60
cag aag caa ggc tgc gac tgt gag tgt ctg ggc ggc ggg cgc atc tcc 240
Lys Lys Gly His Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His
           65           70           75           80

```



cac cag agt cag gac aag aag att cac gtg tac ggc tat tcc atg gcc 288

His Gln Ser Gln Asp Lys Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Ala

85 90 95

tat ggt cct gcc cag cac gcc att tca act gag aaa atc aaa gcc aag 336

Tyr Gly Pro Ala Gln His Ala Ile Ser Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys

100 105 110

tac ccc gac tac gag gtc acc tgg gct aac gac gcc tac

375

Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala Asn Asp Gly Tyr

115

(210) 2

(211) 125

(212) PRT

(213) Homo sapiens

(400) 2

Met Ala Val Ala Asp Leu Ala Leu Ile Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser

1 5 10 15

Asp Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile Arg Val His Ser Ala Pro Arg

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Ala Ala Glu Ser Lys Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys

35 40 45

Trp Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Asp Met

50 55 60

Gln Lys Gln Gly Cys Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser

65 70 75 80

His Gln Ser Gln Asp Lys Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Ala

85 90 95



Tyr Gly Pro Ala Gln His Ala Ile Ser Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys

100

105

110

Tyr Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala Asn Asp Gly Tyr

115

120

125

(210) 3

(211) 16

(212) PRT

(213) emlős

(220)

(221) peptid

(222) (1) ... (16)

(223) konzervált emlősszekvencia

(400) 3

Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln Ser Gln Asp

1

5

10

15

(210) 4

(211) 33

(212) PRT

(213) emlős

(220)

(221) peptid

(222) (1) ... (33)

(223) 2-es konzervált emlősszekvencia(220)

(221) hely



(222) (17)

(223) X = K vagy R

(220)

(221) hely

(222) (27)

(223) X = A vagy G

(220)

(221) hely

(222) (30)

(223) X = P vagy R

(400) 4

Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln Ser Gln Asp

1 5 10 15

Xaa Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Xaa Tyr Gly Xaa Ala Gln

20 25 30

His

(210) 5

(211) 44

(212) PRT

(213) emlős

(220)

(221) peptid



(222) (1) ... (44)

(223) 3-as konzervált emlősszekvencia

(400) 5

Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Asp Met Gln Lys Gln

1 5 10 15

Gly Cys Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln Ser

20 25 30

Gln Asp Lys Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met

35 40

(210) 6

(211) 124

(212) PRT

(213) nyúl

(220)

(221) peptid

(222) (1) ... (124)

(223) nyúl hisztidin-fehérjeproteáz

(400) 6

Ala Ala Ala Gly Leu Ala Gln Ile Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser Asp

1 5 10 15

Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile Arg Val His Ala Ala Pro Pro Ser

20 25 30

Glu Ala Pro Gly Gly Glu Ser Lys Asp Ile Val Arg Gly Tyr Lys Trp

35 40 45

Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Glu Leu Gln

50 55 60



Lys Lys Gly His Asp Cys Glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His  
65 70 75 80  
Gln Ser Gln Asp Arg Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Gly Tyr  
85 90 95  
Gly Arg Ala Gln His Sre Val Ser Thr Glu Lys Ile Arg Ala Lys Tyr  
100 105 110  
Pro Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala Asp Asp Gly Tyr  
115 120

(210) 7

(211) 123

(212) PRT

(213) patkány

(220)

(221) peptid

(222) (1) ... (123)

(223) patkány hisztidin-fehérjeproteáz

(400) 7

Asn Gly Leu Asn Thr Thr Arg Gly Lys Gly Ser Ser Pro Leu Gly Lys  
1 5 10 15  
Asp His Gln Glu Leu Glu Leu Leu Thr Pro Tyr Pro Ala Val Lys Phe  
20 25 30  
Ser Val Gly Pro Thr Arg Ala Thr Arg Ala Tyr Pro Glu Ala Thr Leu  
35 40 45  
Pro Thr Ser Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Glu Leu Gln Lys  
50 55 60



Asn Gly Tyr Asp Cys glu Cys Leu Gly Gly Gly Arg Ile Ser His Gln  
65 70 75 80  
Ser Gln Asp Arg Lys Ile His Val Tyr Gly Tyr Ser Met Gly Tyr Gly  
85 90 95  
Arg Ala Gln His Ser Val Ser Thr Glu Lys Ile Lys Ala Lys Tyr Pro  
100 105 110  
Asp Tyr Glu Val Thr Trp Ala Asp Asp Gly Tyr  
115 120

- (210) 8
- (211) 124
- (212) PRT
- (213) egér

- (220)
- (221) peptid
- (222) (1) ... (124)
- (223) egér hisztidin-fehérjeproteáz
- (400) 9

Met Ala Ala Asp Leu Gly Gln Ile Pro Asp Val Asp Ile Asp Ser Asp  
1 5 10 15  
Gly Val Phe Lys Tyr Val Leu Ile Arg Val His Leu Ala Glu Pro Ser  
20 25 30  
Gly Asp Pro Ala Lys Glu Cys Lys Glu Ile Val Arg Gly Tyr Lys Trp  
35 40 45  
Ala Glu Tyr His Ala Asp Ile Tyr Asp Lys Val Ser Gly Glu Leu Gln  
50 55 60





SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Hisztidin-foszfataz biológiai aktivitású polipeptid, amely erősen specifikus foszfohisztidinre és a molekulatömege 13000-15000, és emlőseredetű szövetből nyerhető legalább egy anioncserélő kromatográfiával, egy gélszűréssel és egy affinitáskromatográfiás lépéssel.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely legalább a DCECLGGGRISHQSQD aminosavszekvencia-motívumot tartalmazza.

3. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely legalább a DCECLGGGRISHQSQDX<sup>1</sup>KIHVYGYSMX<sup>2</sup>YGX<sup>3</sup>AQH aminosavszekvencia-motívumot tartalmazza, ahol X<sup>1</sup> jelentése K vagy R, X<sup>2</sup> jelentése A vagy G és X<sup>3</sup> jelentése P vagy R.

4. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely legalább a YHADIYDKVSGDMQKQGCDCCECLGGGRISHQSQDKKIHVYGYSM aminosavszekvencia-motívumot tartalmazza.

5. Hisztidin-foszfataz biológiai aktivitású polipeptid, amely nagymértékben specifikus foszfohisztidinre és a molekulatömege 13000-15000, és a következő aminosavszekvenciát tartalmazza:

(M)AVADLALIPDVIDSDGVFKYVLIRVHSAPRSGAPAAESKEIVRGYKWA EYH  
ADIYDKVSGDMQKQGCDCCECLGGGRISHQSQDKKIHVYGYSMAYGPAQHAISTEK  
IKAKYPDYEVTWANDGY.



6. Hisztidin-foszfataz biológiai aktivitású polipeptid, amely erősen specifikus foszfohisztidinre és a molekulatömege 13000-15000, és amelynek aminosavszekvenciája 64-99%-ban homológ a 3. igénypont szerinti szekvenciával.

7. A 6. igénypont szerinti polipeptid, amely a következő aminosavszekvenciát tartalmazza:

AAAGLAQIPDVIDSDGVFKYVLIRVHAAPPSEAPGGESKDIVRGYKWA EYHADI  
YDKVSGELQKKGHDCECLGGGRISHQSQDRKIHVYGYSMGYGRAQHSVSTEKIRA  
KYPDYEVTWADDGY.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódoló DNS.

9. A 8. igénypont szerinti DNS, amely a következő nukleotidszekvenciát tartalmazza:

(ATG) GCGGTGGCGGACCTCGCTCTCATTCTGATGTGGACATCGACTCCGACGG  
CGTCTTCAAGTATGTGCTGATCCGAGTCCACTCGGCTCCCCGCTCCGGGGCTCCG  
GCTGCAGAGAGCAAGGAGATCGTGCGCGGCTACAAGTGGGCTGAGTACCATGCGG  
ACATCTACGACAAAGTGTCGGGCGACATGCAGAAGCAAGGCTGCGACTGTGAGTG  
TCTGGGCGGGCGGCATCTCCCACCAGAGTCAGGACAAGAAGATTCACGTGTAC  
GGCTATTCCATGGCCTATGGTCCTGCCCAGCACGCCATTTCAACTGAGAAAATCA  
AAGCCAAGTACCCCGACTACGAGGTCACCTGGGCTAACGACGGCTAC

10. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet tartalmazó gyógyászati készítmény, megfelelő esetben alkalmas kötőanyagokkal, hordozókkal és más, aktív alkotórészekkel együtt.



11. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti polipeptiddel szemben termelt ellenanyag.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Svingor Ádám

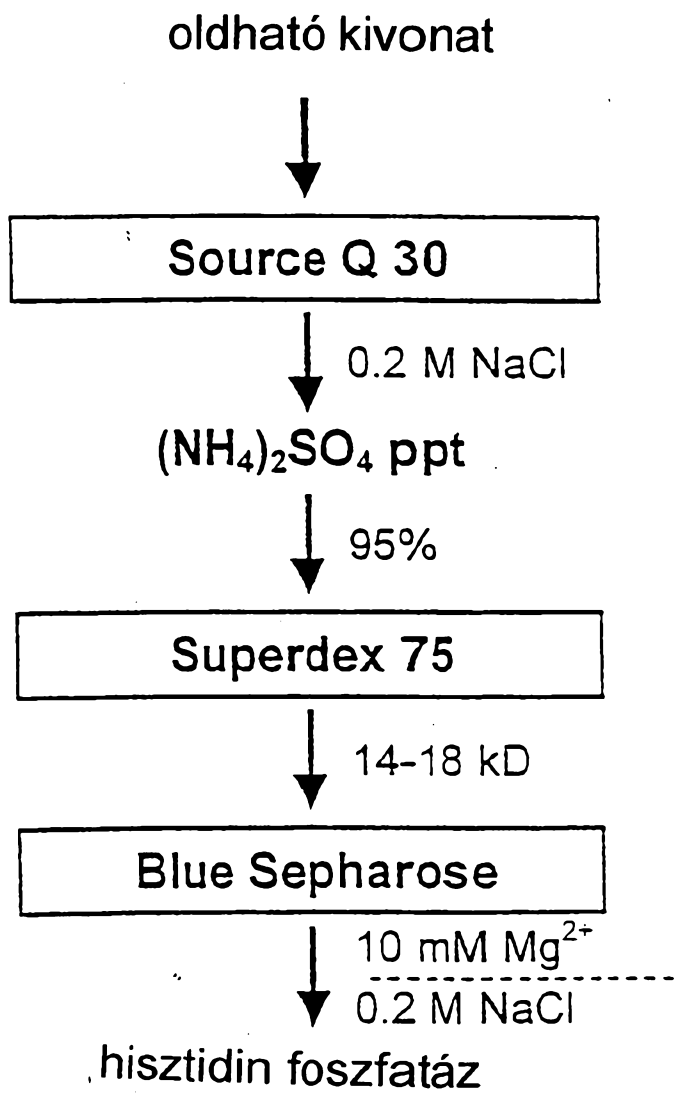
szabadalmi ügyvivőjelölt

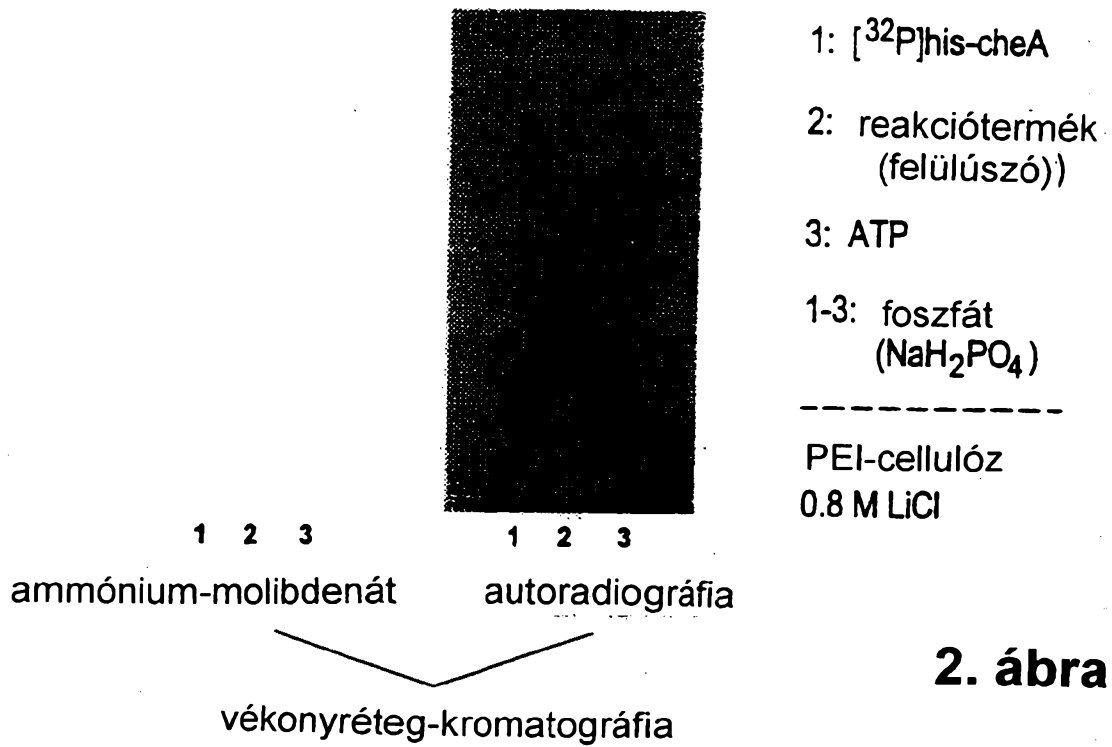
37 + 10 42 kdt

1497

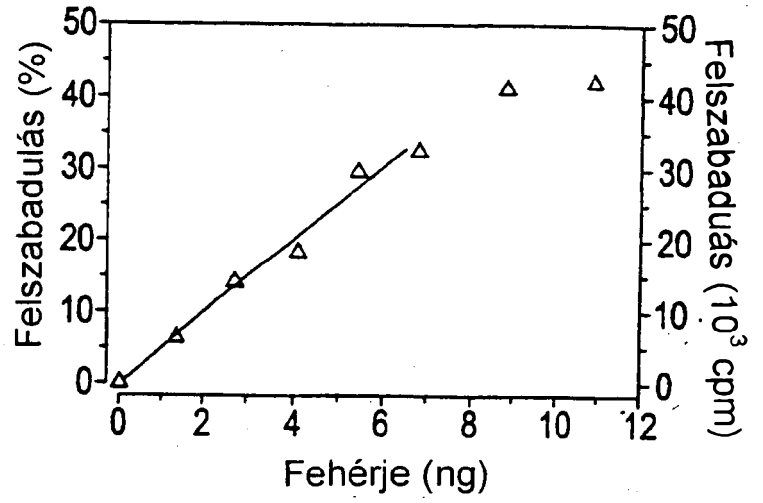
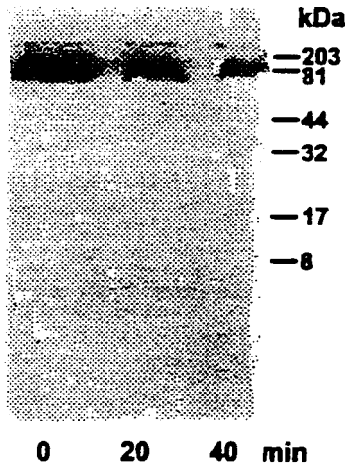
2002.02.13.

1. ábra

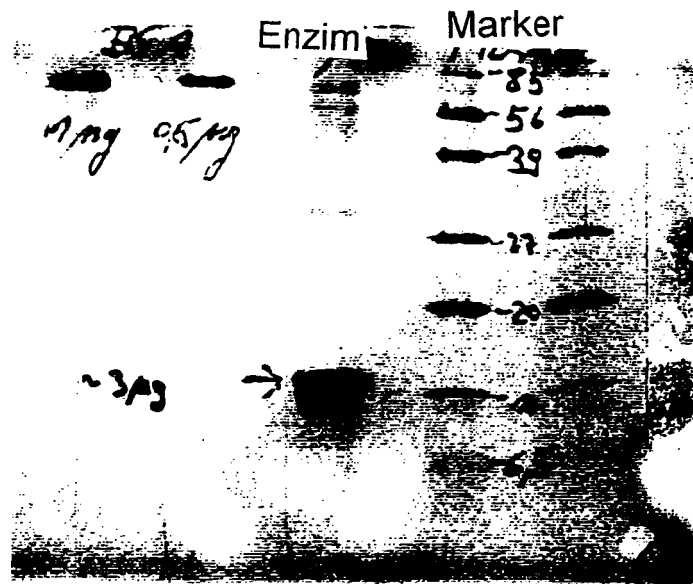




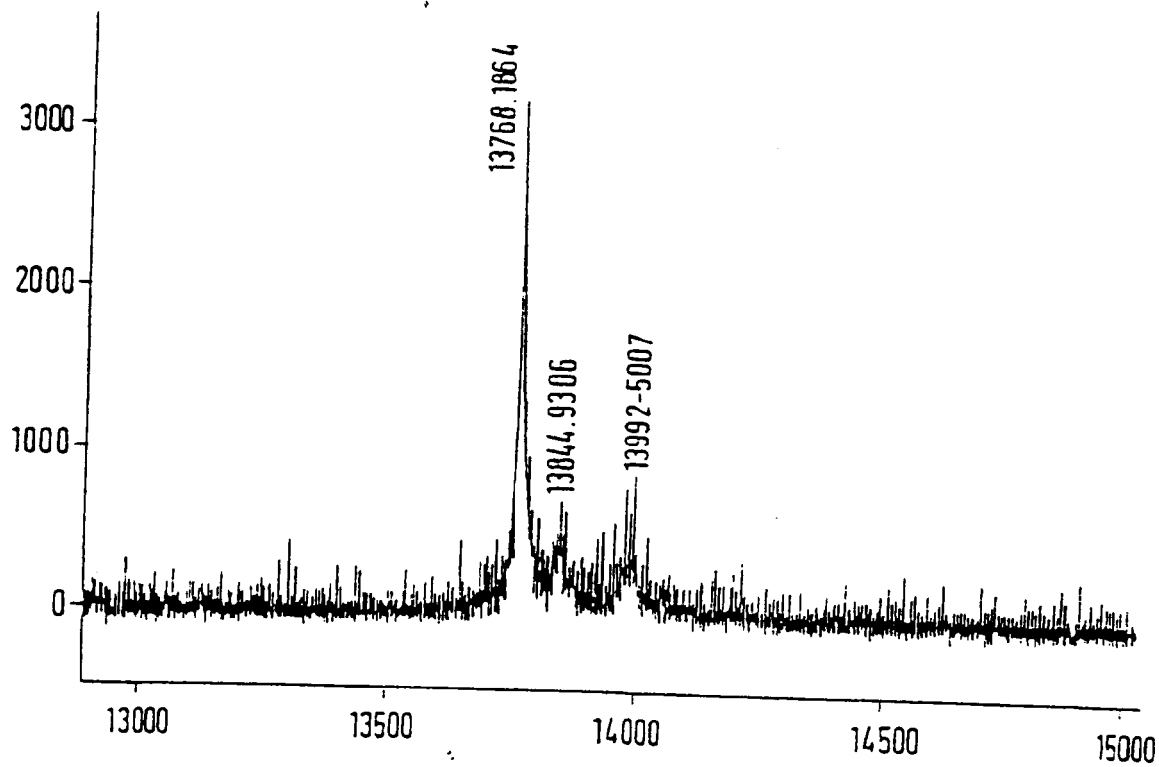
**2. ábra**



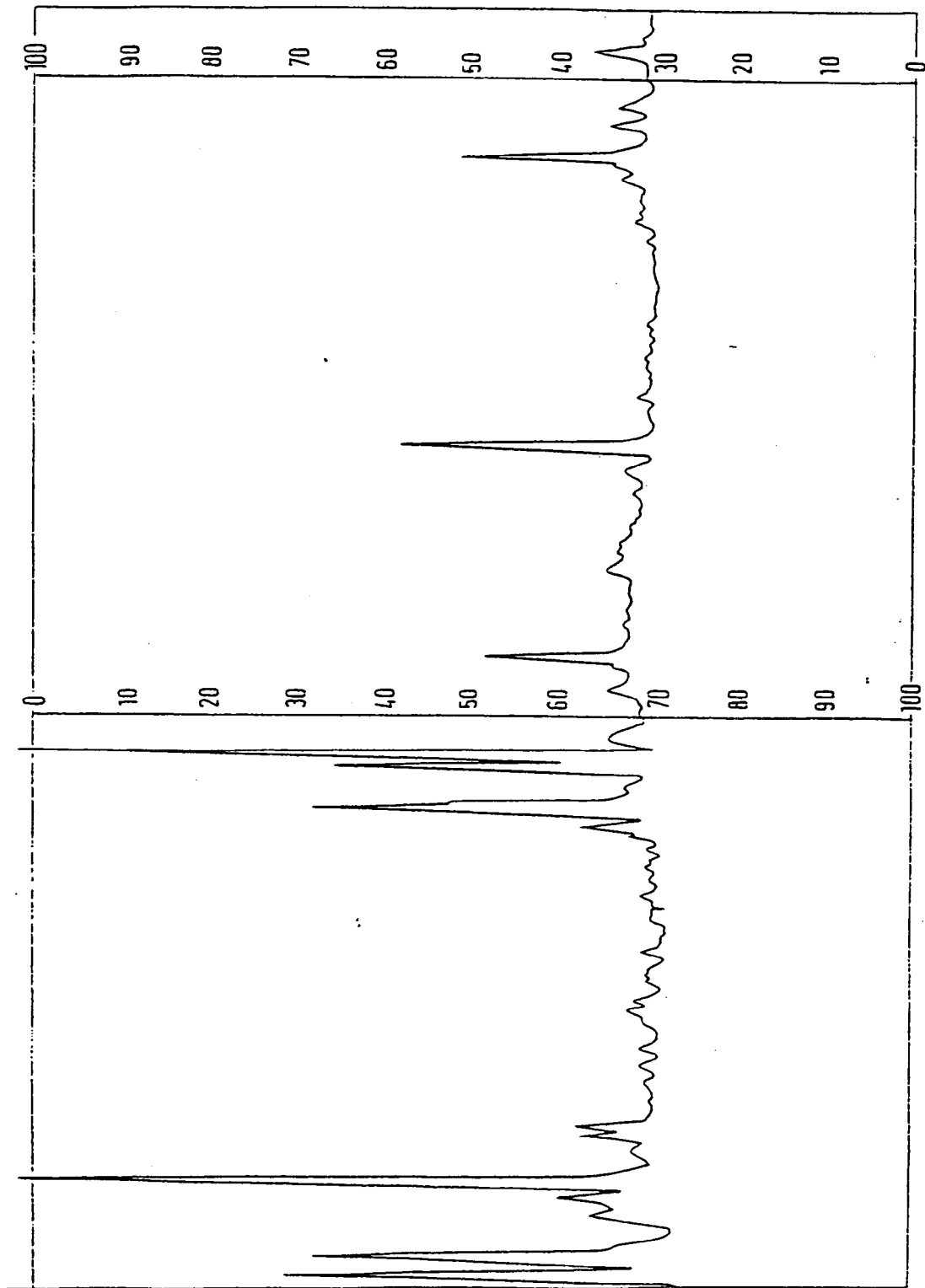
3. ábra



4. ábra



5. ábra



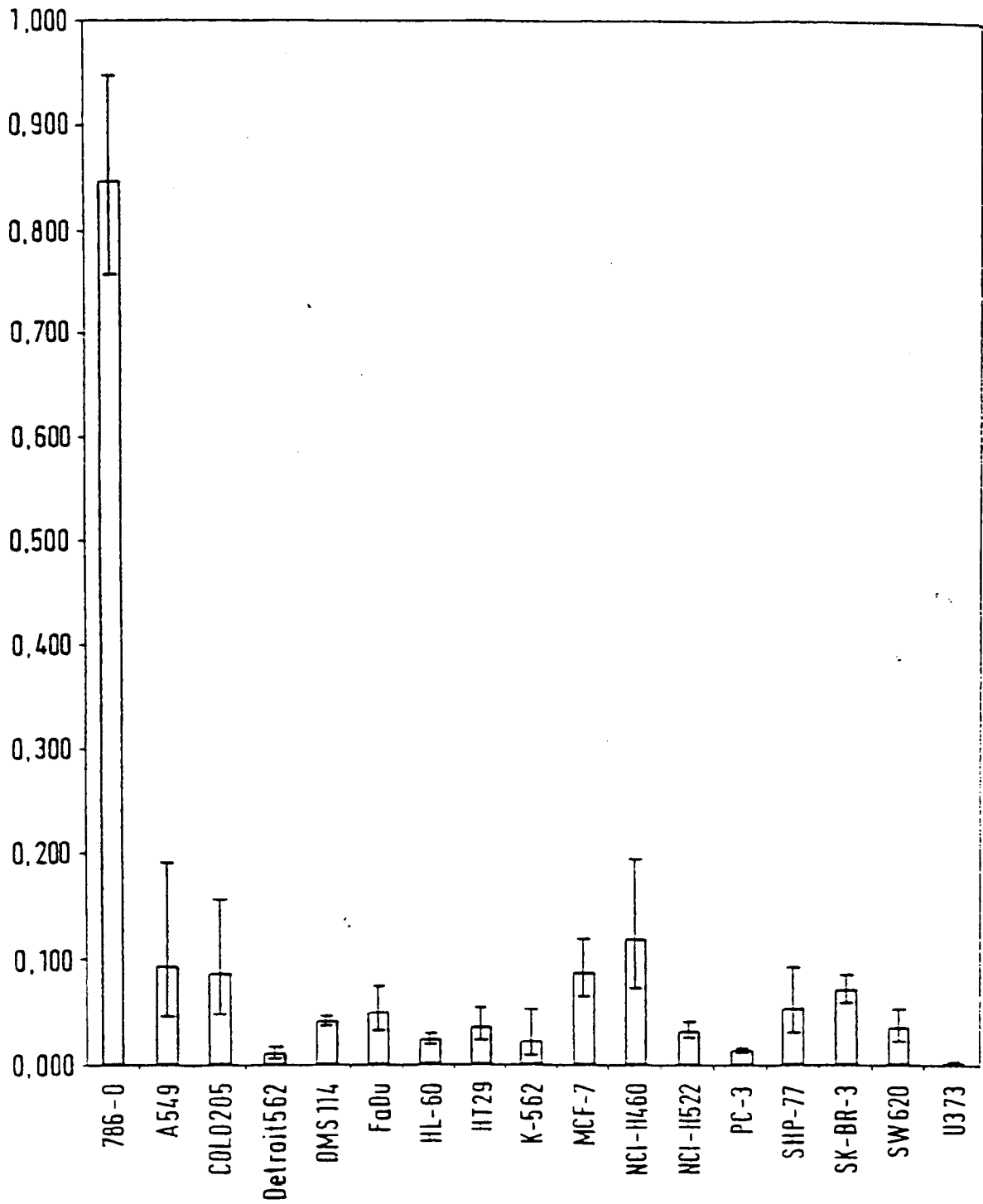
6. ábra

**7a ábra**

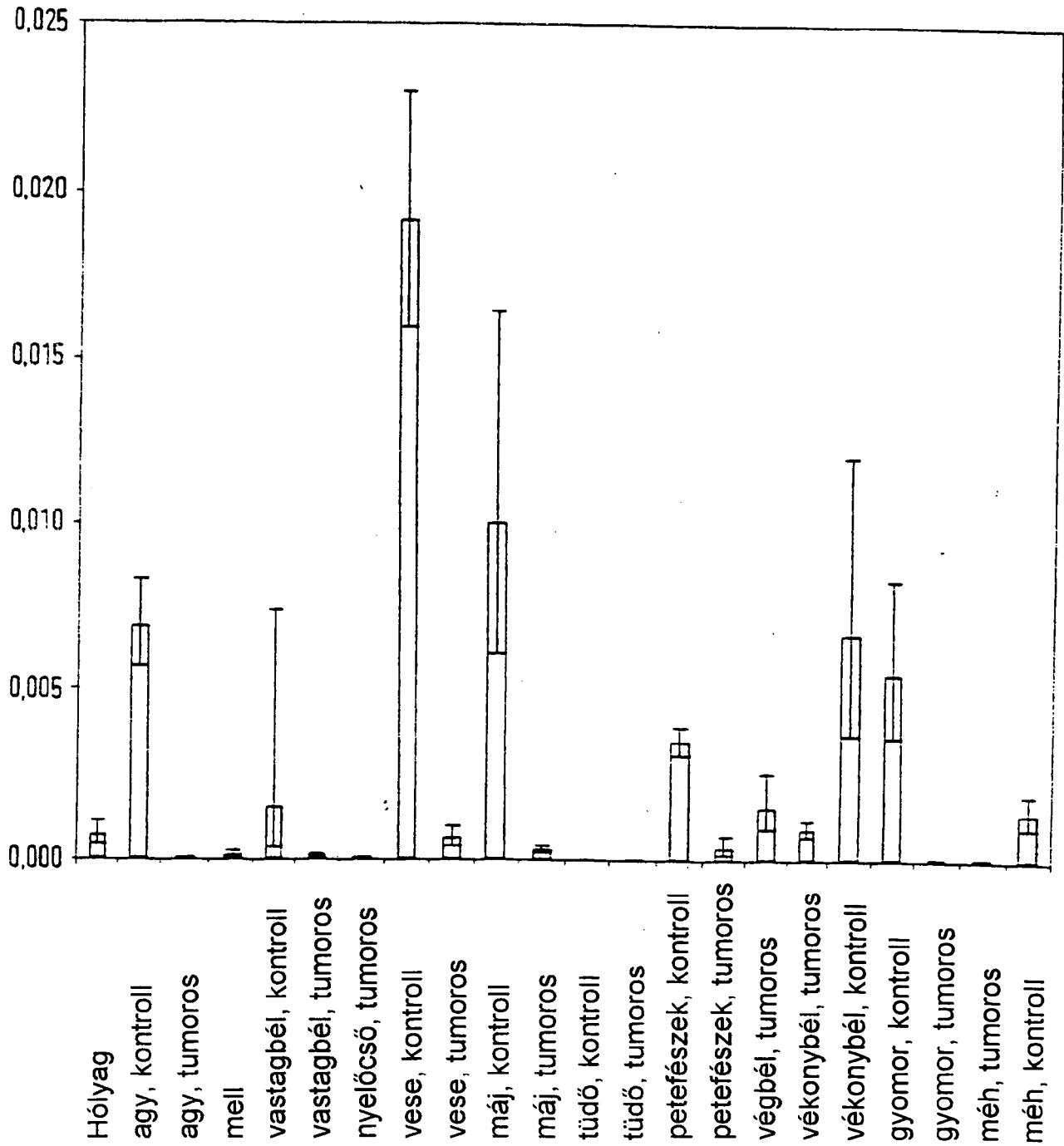
GTGGACATCGACTCCGACGGCGTCTTCAAGTACGTGCTGATTTCGAGTC  
 CACGCGGGCGCCGCCCTCCGAAGCCCCGGGCGGGCGAGAGCAAGGACATC  
 GTGCGTGGCTACAAGTGGGCCGAGTACCACGCCGACATCTACGACAAG  
 GTGTCGGGCGAGCTGCAGAAGAAGGGCCATGACTGCCGAGTGCCTGGGC  
 GGCGGGCGCATCTCCCACCAGAGCCAGGACCGGAAGATCCACGTGTAC  
 GGCTACTCCATGGGCTACGGCCGGGCCCAGCACTCCGTCTCCACCGAG  
 AAGATCAGAGCCAAGTACCCCGACTACGAGGTCACCTGG

**7b ábra**

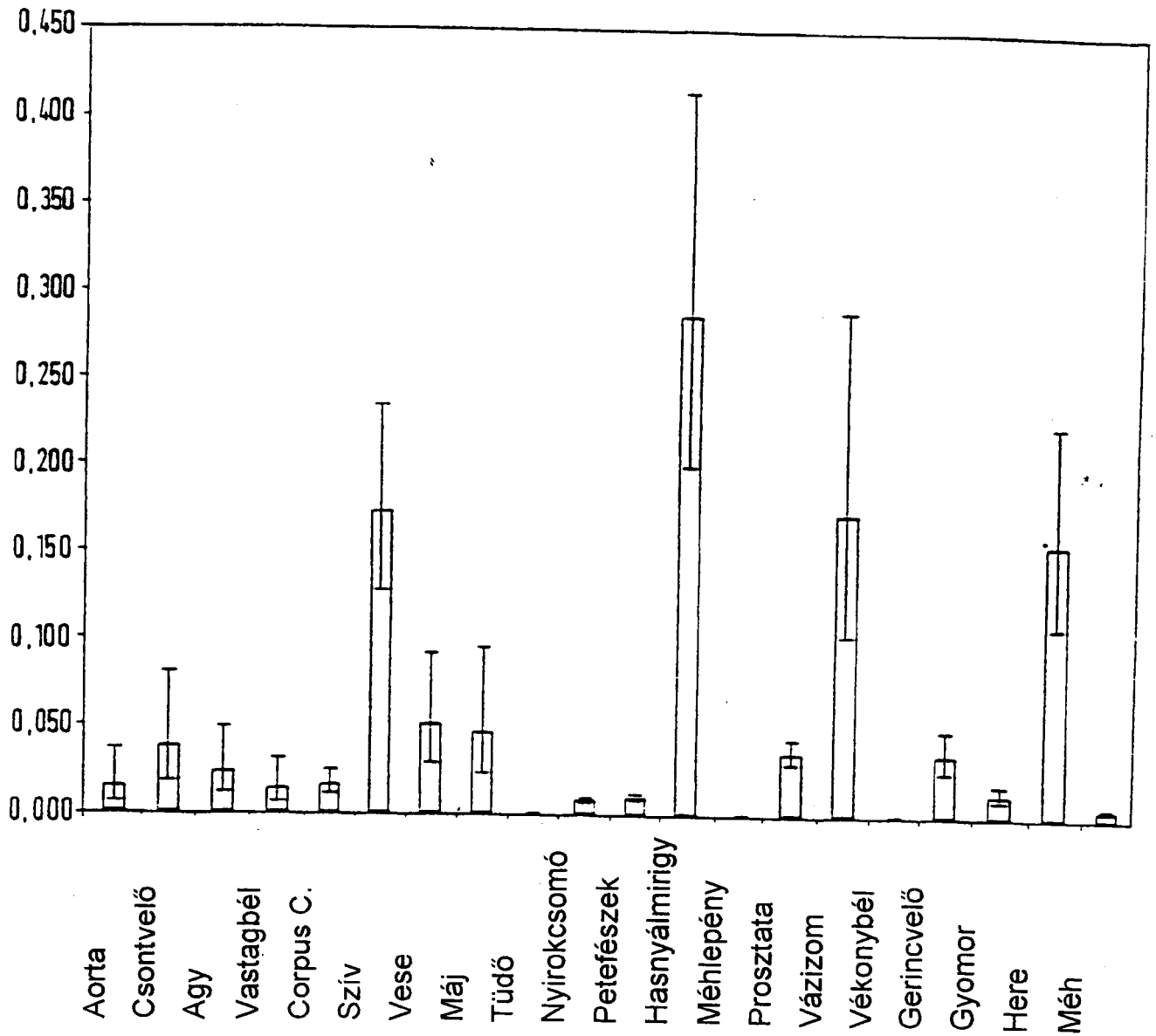
AAAGLAQIPDVIDSDGVFKYVLIRVHAAPPSEAPGGESKDIVRGYKW  
 AEYHAD IYDKVSGELQKKGHDCECLGGGRI SHQSQDRKIHVYGYSMGY  
 GRAQHSVSTEKIRAKYPDYEV TWADDGY



8a ábra



8b ábra



8c ábra