

ANGIOSZTATIN-KÖTŐ PROTEIN

KIVONAT

A találmány megoldást nyújt az angiosztatinnal kapcsolatos korábbi problémákra (rövid élettartam, gyakori beadás, nagy dózisok), mégpedig egy olyan, „ABP-1” névvel ellátott humán protein segítségével, amely humán proteinre az jellemző, hogy hozzá tud kötődni a plazminogénnek egy olyan fragmentumához, előnyösen a plazminogén első négy Kringle doménjéhez (K1-K4), amely fragmentum meghatározó fontosságú az anti-angiogén biológiai aktivitás szempontjából.

A találmány kiterjed a találmány szerinti proteint kódoló izolált nukleinsav-molekulára, a nukleinsavat tartalmazó vektorra, a vektorral transzformált vagy transzfektált rekombináns sejtre, a találmány szerinti proteinnel specifikusan kötődő antitestre, az antitestet expresszáló rekombináns sejtre, továbbá a találmány szerinti protein gyógyászati, illetve gyógyszerészeti alkalmazására is.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül egy szkrínelési eljárás olyan molekulák azonosítására, amelyek képesek kölcsönhatásba lépni a találmány szerinti proteinnel.

jellemezés a 10. sz. p.

P. 10. sz. p.

ANGIOSZTATIN-KÖTŐ PROTEIN

A találmány az angiogenezissel áll kapcsolatban, közelebb-ről olyan, új molekulákra, például proteinekre és peptidekre vonatkozik, amelyek révén új anti-angiogén anyagok fejleszthetők ki. A találmány kiterjed az ilyen anyagok előállítási eljárásaira is.

Az emberi test csaknem valamennyi szövete nagyon vékony, az emberi hajnál is vékonyabb vérerek finom hálózataát tartalmazza. Általában sem a vérerek száma, sem pedig mérete nem növekszik, mivel a vérereket befedő endothelialis sejtek osztódása lassú, ténylegesen több évig tart. Kivételt képez például a sebgyógyulás és a menstruáció, amikor a vérerek gyorsan növekednek. Ezekben az esetekben azonban a gyors növekedés csak korlátozott időtartamú, és az említett esemény lejátésozódása után a sejtosztódás sebessége ismét a normális értékre lassul.

Angiogenezisnek azt a folyamatot nevezzük, amelynek során egy meglévő érből új vérerek alakulnak ki. Angiogenezis olyan betegségekkel és/vagy állapotokkal jár együtt, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: rák, tumorok képződése, valamint diabetes retinopathia, rheumatoid arthritis, sőt még bizonyos gyulladásos állapotok is. Emiatt világszerte intenzíven kutatják azokat a megoldásokat, amelyek révén megelőzhető, illetve gátolható az angiogenikus folyamat. Amennyiben erre lehetőség nyílna, a tumornövekedés kontrollálható lenne, illetve jól használható terápiás eljárásokat lehetne kidolgozni az előbbiekben említett állapotok kezelésére.

Számos részbizonyítékot találtak már arra, hogy néhány mm^3 -nél nagyobb növekedés esetén a tumorok a vérerek *de novo* képződésétől függenek. Az angiogenezist a tumorsejtek által kiválasztott faktorok indítják meg (triggerelik). A közelmúltban ismerték fel, hogy a tumorok a szabaddá tett proteolitikus aktivitás útján olyan peptidfragmentumokat generálnak, amelyek anti-angiogén aktivitást mutatnak. Az említett peptidfragmentumok egyik példája az angiosztatin molekula, ami a plazminogénnek egy fragmentuma.

A plazminogén egy olyan anyag a vérplazmában, amely aktíválódva plazmint vagy fibrinolizint, azaz egy, a vér koagulációjában szerepet játszó enzimet hoz létre. Önmagában a plazminogénnek nincs detektálható anti-angiogén aktivitása. A korábbiakban azt találták [Judah Folkman et al., Harvard Medical School, Boston], hogy ennek az endogén proteinnak egy része, közelebbről az első négy Kringle doménje képes megakadályozni az endothelialis sejtek osztódását. A plazminogénnek ezt részét nevezték el angiosztatinnak. A szakterületen folyó kutatások jelentős része irányul erre a molekulára. A technika állása alapján ismert, hogy az angiosztatin *in vitro* specifikusan gátolja az endothelialis sejteket és *in vivo* blokkolja az angiogenezist. Angiosztatin szubkután injekciókkal SCID egerekben végzett szisztémás kezelések a tumorok széles körében indukálnak *in vivo* alvó állapotot [O'Reilly et al., NATURE MED., 2, 689 (1996)]. Az állatokban még több hónapos kezelés után sem észleltek detektálható toxicitást. Az angiosztatin két szintű specifikitást mutat: *in vitro* specifikusan csak az endothelialis

sejtekben indukál apoptosist [Claesson-Welsh *et al.*, PROC. NATL. ACAD. SCI., USA, 95, 5579 (1998)], illetve *in vivo* csak az angiogenezisben aktív endothelialis sejtekre gyakorol hatást. Az eddigiekben még észlelték, hogy az angiosztatin negatív hatást fejtene ki a kialakult erekben lévő sejtekre.

Az angiosztatinnak valóban van néhány előnyös tulajdonsága, egyebek mellett például azért, mert az angiosztatin egy endogén anyag. Azonban nem elhanyagolhatók azok a hátrányok sem, amelyek az angiosztatin lehetséges gyógyászati célú felhasználásával kapcsolatban felmerülnek. Ezek egyike a vegyület nagyon rövid, órákban mérhető élettartama, ami gyakori beadást tesz szükségessé. Emellett a vegyület hatékonysága meglehetősen gyengének bizonyult, ami miatt nagy dózisokat kell alkalmazni. Ez a két hátrány önmagában is elég erős indítékot jelent ahhoz, hogy a gyógyszerként történő felhasználáshoz a kutatások tovább folyjanak alternatív, kisebb és/vagy hatékonyabb molekulák kifejlesztése érdekében.

A jelen találmány megoldást nyújt az angiosztatinnal kapcsolatos fenti problémákra, mégpedig egy olyan, „ABP-1” névvel ellátott humán protein segítségével, amely humán proteint az a képessége definiál, amelynek révén hozzá tud kötődni a plazminogénnek egy olyan fragmentumához, előnyösen a plazminogén első négy Kringle doménjéhez (K1-K4), amely fragmentumra az anti-angiogén biológiai aktivitás a jellemző.

Az ABP-1 a 2. számú szekvenciában (SEQ ID NO. 2) láthatóhoz lényegében hasonló aminosav-szekvenciát tartalmaz. Az ABP-1 variánsai és fragmentumai is a találmány oltalmi körébe tartoz-

nak.

Ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartoznak az ABP-1 más fajokban, különösen egyéb emlősökben megtalálható homológjai is.

A találmány további tárgyát képezik olyan izolált nukleinsav molekulák, amelyek egy olyan szekvenciát tartalmaznak, amely szekvencia ABP-1-et vagy egy, az ABP-1-hez lényegében hasonló polipeptidet, ezen belül variánsokat, fragmentumokat és homológokat kódol.

Szintén a találmány tárgyát képezik olyan nukleinsav próbák, amelyek szekvenciája az 1. számú szekvenciából (SEQ ID NO. 1) származik; ezeket a próbákat kutatási eszközökként, valamint diagnosztikai eljárásokban használhatjuk például a szövetekben és sejtekben zajló ABP-1 bioszintézis detektálására és mérésére.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi egy diagnosztikai eljárás szövetekben és sejtekben az ABP-1 vagy variánsai és fragmentumai jelenlétének és mennyiségének a detektálására.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy szkrínelési eljárás olyan vegyületek azonosítására, amely vegyületek képesek kölcsönhatásba lépni az ABP-1-gyel vagy variánsaival és fragmentumaival. A szkrínelési eljárás bármilyen, az ezen a területen jártas szakember számára ismert összeállítású (konfigurációjú) lehet.

A találmány tárgyát képezik továbbá az említett szkrínelési eljárással azonosított, az ABP-1 vagy variánsai és fragmentumai biológiai aktivitását modulálni képes vegyületek is.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy olyan gyógyszerkészítmény, amely hatóanyagként egy, a fenti szkrínelési eljárással azonosított vegyületet tartalmaz.

A találmány tárgyát képezik ezenkívül az ABP-1-ben vagy variánsaiban és fragmentumaiban lévő epitopok ellen irányuló antitestek, valamint az antitesteket termelő sejtek is.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan vektor, amely az ABP-1-nek vagy variánsainak és fragmentumainak a nukleotidszekvenciáját tartalmazza.

Végül a találmány tárgyát képezik az előbbieken kívül az előbbi vektort tartalmazó sejtek is.

A leírásban alkalmazott kifejezések az alábbiakban meghatározott jelentésűek.

A jelen leírásban alkalmazott „angiogenezis” kifejezés új vérereknek egy szövetben vagy szervben történő kialakulására vonatkozik. Amint azt a fentiekben már említettük, normál élet-tani körülmények között emberekben és állatokban angiogenezis csak nagyon különleges és nagyon korlátozott helyzetekben fordul elő. Például normális angiogenezis történik a sebgyógyulásban, a magzati és embrionális fejlődés során, valamint a corpus luteum és a placenta kialakulásában.

Az „endothelium” kifejezés a sík epithelialis sejteknek azt a vékony rétegét jelöli, amely a vérsavóüregeket, a nyirok-ereket és a vérereket határolja. Az „endothelialis gátló aktivitás” kifejezés az endothelialis kapilláris endothelialis sejtek növekedését gátló képességre vonatkozik.

Az „egy angiogenezissel kapcsolatos protein” kifejezés egy

olyan proteint jelöl, amely képes hatást kifejteni az angiogenezisben, amilyen például egy anti-angiogén anyagot kötő receptor.

A 2., 3. és 4. számú aminosav-szekvenciára (SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, és SEQ ID NO. 4) vonatkozó „lényegében hasonló” kifejezés egy olyan aminosav-szekvenciát jelöl, amely nagyfokú szekvenciahomológiát mutat a 2., 3. és 4. számú aminosav-szekvenciával. A nagyfokú homológia legalább hozzávetőleg 80 %-os aminosav-homológiát, előnyösen legalább hozzávetőleg 90 %-os aminosav-homológiát, még előnyösebben legalább hozzávetőleg 95 %-os aminosav-homológiát, és legelőnyösebben legalább hozzávetőleg 98 %-os aminosav-homológiát jelent.

A „specifikusan hibridizálódó” kifejezés azt jelenti, hogy egy molekula kapcsolódása, megkettőződése vagy hibridizációja szigorú körülményekcsak egy egyedi nukleotidszekvenciához kötődik, ha a szekvencia egy komplex (például teljes celluláris) DNS vagy RNS keverékben van jelen. A „szigorú körülmények” olyan körülményeket jelentenek, amelyek között egy próba csak a target alszekvenciájává hibridizálódik, más szekvenciává nem. A szigorú körülmények szekvenciafüggőek és eltérő körülmények között különbözőek. Hosszabb szekvenciák specifikusan magasabb hőmérsékleteken hibridizálódnak. A szigorú körülményeket általában úgy választjuk meg, hogy azok körülbelül 5 °C-kal alacsonyabbak legyenek, mint a specifikus szekvencia meghatározott ionerősség és pH melletti termikus olvadáspontja (T_m). A T_m (meghatározott ionerősség, pH és nukleinsav-koncentráció mellett) az a hőmérséklet, amelynél egyensúlyban a próbák 50 %-a

komplementer a target szekvenciává hibridizáló target szekvenciával. (Mivel a target szekvenciák általában feleslegben vannak jelen, a T_m -nél a próbák 50 %-as foglalt egyensúlyi állapotban). Jellemzően a szigorú körülmények olyanok, amelyekben a sókoncentráció 7,0-8,3 pH-nál kisebb, mint körülbelül 1,0 M nátriumion, általában körülbelül 0,01-1,0 M nátriumion (vagy más sók), és a hőmérséklet legalább körülbelül 30 °C rövid (például 10-50 nukleotidból álló) próbák esetén, illetve legalább 60 °C hosszabb próbáknál. Szigorú körülményeket biztosíthatunk destabilizáló szerek, például formamid hozzáadásával is.

Az 1. ábra a ^{125}I izotóppal jelzett angiosztatinnak és plazmigonénnek a borjú mikrokapilláris endothelialis sejtekhez történő *in vitro* kötődését mutatja be.

A 2. ábra az angiosztatin-kötő proteinek izolálásának a stratégiáját mutatja be.

A 3. ábra pozitív élesztő klónok szelektív körülmények közötti növekedését mutatja be.

A 4. ábra a rekombináns „Big-3”-nak az angiosztatinhoz, illetve a plazminogénhez történő kötődését mutatja be.

Az 5. ábra a „Big-3” térképét mutatja be.

A 6. ábra a találmány szerinti angiosztatin-receptort kódoló génnek a szabadon olvasható keretét (2. keret) mutatja be. Az egyéb lehetséges keretek nem termelnek semmilyen tényleges proteint.

A 7. ábra a magzati és a felnőtt mRNS, valamint az endothelialis sejtek expressziós jellemzőit mutatja be.

A 8. ábra az ABP-1 gén különböző szövetekben történő

expressziójának a relatív mértékét mutatja be. (További részleteket a kísérleti részben ismertetünk.)

A 9A. ábra a GFP-jelzett ABP-1 receptor celluláris lokalizációját mutatja átmenetileg transzfektált HeLa sejtekben. A 9B. ábra a GFP-jelzett ABP-1-nek az angiosztatinnal végzett inkubálás utáni reorganizációját mutatja be. A 9C. ábra az angiosztatinnak az ABP-1-hez történő kötődését mutatja be. (További részleteket a kísérleti részben ismertetünk.) A 9D. ábra az F-aktin ellen rodamin-jelzett falloidinnel végzett festéssel együtt az ABP-1 immunofestődését mutatja. Az ABP-1 fokális adhézciókban és membránfodrokban lokalizált (nyilak).

A 10. ábra az ABP-1-hez kapcsolódó kináz aktivitásnak az angiosztatin hozzáadása utáni mérséklő szabályozását mutatja be.

A 11. ábra egy SDS-PAGE autoradiográfiás felvételét mutatja be, ami azt bizonyítja, hogy az ABP-1 mediálja az angiosztatin-indukált fokális adhézíós kináz aktivitást. (További részleteket a kísérleti részben ismertetünk.)

A jelen találmány tehát egy plazminogén-fragmentumhoz, előnyösen egy N-terminális fragmentumhoz, például az 1-4. Kringle doménekhez és/vagy az 5. Kringle doménhez kötődni képes izolált, humán angiogenezissel kapcsolatos proteinre vonatkozik. A találmány szerinti protein plazminogén-fragmentumok receptoraként, különösen az angiosztatin és/vagy a plazminogén 5. Kringle doménjének egy receptoraként funkcionál. A találmány szerinti proteint biológiai vagy kémiai eljárásokkal (például rekombináns gén expresszióval vagy peptidszintézissel) állít-

hatjuk elő. A rekombináns módszerek körébe tartozik — egyebek mellett — például a gén klónozás vagy az *in vitro* eljárásokkal végzett amplifikáció, amilyen például a polimeráz láncreakció (PCR), a ligáz láncreakció (LCR), a transzkripción alapuló amplifikációs rendszer (TAS) és az önfenntartó szekvencia replikációs rendszer (SSR). Az ezen a területen jártas szakember számára jól ismert számos különféle klónozási és *in vitro* amplifikációs módszer. Ilyen módszereket ismertetnek — egyebek mellett — például a következő helyen: Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, METHODS IN ENZIMOLGY, 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger). A találmány magában foglalja azokat a proteineket is, amelyek a 2., 3. és 4. számú aminosav-szekvenciában (SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, és SEQ ID NO. 4) láthatóhoz lényegében hasonló aminosav-szekvenciákat tartalmaznak. A 2. számú szekvenciájú protein szekvenciának a jelenleg hozzáférhető adatbázisokban szereplő szekvenciákkal végzett összehasonlítása 23,7 %-os homológiát mutatott egy olyan *Caenorhabditis elegans* hipotetikus proteinnel, amelyet egy, az említett organizmus III. kromoszómájának a centrális csoportjában (cluster) elhelyezkedő valódi szabadon olvasható keret kódol [az organizmust a következő helyen ismertették: R. Wilson et al., NATURE, 368, 32-38 (1994)]. A hipotetikus proteinnek nem tulajdonítottak semmilyen funkciót.

A fentiekben megadott definíciónak megfelelően a találmány magában foglalja az összes olyan polipeptidet, amely egyrészt képes megkötni egy plazminogén fragmentumot, másrészt olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amelyek a 2., 3. és 4. szá-

mú aminosav-szekvenciával legalább hozzávetőleg 80 %-os aminosav-homológiát, előnyösen legalább hozzávetőleg 90 %-os aminosav-homológiát, még előnyösebben legalább hozzávetőleg 95 %-os aminosav-homológiát, és legelőnyösebben legalább hozzávetőleg 98 %-os aminosav-homológiát mutat. Ezek a variánsok például alternatív illeszkedésből vagy ugyanazon organizmus különböző szöveteiben történő eltérő expresszióból származhatnak. A variáns formák aminosav inszercióval, delécióval vagy szubsztitúcióval jellemezhetők. Az ABP-1 egyik előnyös variáns formáját az alábbiakban ismertetett 3. számú szekvencia (SEQ ID NO. 3) mutatja be.

Az egyik különösen előnyös találmány szerinti megoldás az ABP-1-nek egy Big-3-nak nevezett fragmentumára vonatkozik, amelyet részletesen az alábbiakban ismertetünk, és amely magában foglalja az ABP-1 angiosztatin-kötő doménjét [4. számú szekvencia (SEQ ID NO. 4)].

A találmány ezenkívül kiterjed az olyan peptidekre is, amelyek a 2. számú szekvenciából vagy variánsaiból, illetve fragmentumaiból legalább körülbelül 5, előnyösen legalább körülbelül 10 egymást követő aminosavcsoportot tartalmaznak. A peptid legelőnyösebb mérete azonban a peptid jövőbeni tervezett felhasználásától függ, így a találmány nem korlátozódik az aminosavcsoportok fentiekben megjelölt számára.

A találmány magában foglalja továbbá az ABP-1 és a Big-3 más fajokban, különösen egyéb emlősökben előforduló homológjait is. A „homológ” kifejezés olyan proteineket jelöl, amelyek — függetlenül a megfelelő aminosav-szekvenciák közötti homológ-

ától — a találmány szerinti proteinek biológiai funkciójával lényegében azonos biológiai funkciót látnak el.

A találmány tárgyát képezik ezenkívül a találmány szerinti proteineket és peptideket, valamint ezek fentiekben meghatározott variánsait, fragmentumait és homológjait kódoló szekvenciát tartalmazó izolált nukleinsav-molekulák is. Az egyik előnyös megoldás szerint a nukleinsav-molekula szekvenciája az 1. számú szekvenciának (SEQ ID No. 1) megfelelő. Ez a szekvencia egy 5' (az 1. nukleotidtól a 796. nukleotidig tartó) és egy 3' (a 2825. nukleotidtól a 6463. nukleotidig tartó) nem-transzlált régiót tartalmaz. Egy másik előnyös megoldás értelmében a nukleinsav-molekula az 1. számú szekvencia 797. nukleotidjától a 2824. nukleotidjáig terjedő szekvenciával rendelkezik. Egy ismét további megoldás szerint a nukleinsav-szekvencia a Big-3 nevű ABP-1 fragmentumot kódolja, és az 1. számú szekvencia 2180. nukleotidjától a 2608. nukleotidjáig terjedő nukleotidszekvenciából áll. A találmány kiterjed valamennyi olyan, a találmány szerinti polipeptideket kódoló nukleotidszekvenciára, amely a genetikai kód degenerációja következtében tér el az 1. számú szekvenciának megfelelő nukleotidszekvenciától. A szekvenciaanalízis kimutatott egy lehetséges polimorfizmust az 1. számú szekvencia 1199-1201 kodonjában, amelyben egy Asn, Ser vagy Asp kodon lehet jelen; azt találtuk ezenkívül, hogy egy további, az 1. számú szekvencia 1238-1246 nukleotid pozícióknak megfelelő régió kódolja a Glu-Leu-Ala tripeptidet vagy a Thr-Trp-Pro tripeptidet. Az ABP-1 aminosav-szekvenciájának ezeket a variációit a 3. számú szekvenciában (SEQ ID NO. 3) mutatjuk

be, amely egy további előnyös találmány szerinti proteint alkot. Ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartoznak az ABP-1-nek vagy fragmentumának homológjait kódoló nukleotid molekulák is.

A találmány tárgyát képezik továbbá az olyan nukleinsavak is, amelyek szigorú körülmények között képesek specifikusan a fentiekben ismertetett találmány szerinti nukleinsav-molekulák egyikévé hibridizálódni.

Ahol a találmány szerinti nukleinsavakat próbákként kívánjuk alkalmazni, gyakran szükség lehet a szekvenciák detektálható markerekkel történő megjelölésére. Az ilyen markerek körébe tartozik minden olyan kompozíció, amely spektroszkópai, fotokémiai, biokémiai, immunokémiai, elektromos, optikai vagy kémiai úton detektálható. A markereket az ezen a területen jártas szakember számára jól ismert módszerek bármelyikével beépíthetjük. A markerek detektálására alkalmas eljárások ugyan csak jól ismertek a szakterületen, illetve a szakirodalom részletesen tárgyalja az ilyen detektálási eljárásokat. A próbák jól alkalmazhatók a diagnosztikai felhasználásokban, például a szövetekben és sejtekben zajló ABP-1 bioszintézis detektálására és mérésére.

A találmánynak egy további tárgya olyan szkrínelési eljárásokra vagy vizsgálatokra vonatkozik, amelyekben az angiosztatin és/vagy az 5. Kringle tulajdonságaival azonos jellemzőket mutató molekulákat szűrjük ki. Az egyik jellemző szkrínelési eljárásban az angiosztatin szignál transzdukciós folyamatot aktiválni képes molekulákat egy nagyteljesítményű sejttalapú

szkrínnel azonosítjuk. Az ilyen szkrín egy olyan angiosztatin-érzékeny elem által vezetett riporter génre épül, amely stabilan transzfektálódott egy angiosztatin-érzékeny sejtvonalba. Az érzékeny elem egy riporter génhez, például a luciferáz génjéhez kötődik; a vegyületnek a találmány szerinti proteinhez történő kapcsolódása után az intracelluláris folyamat aktiválódva fokozza a reprotoer gén aktivitását, amit detektálni tudunk.

Az ismertetett szkrínelési eljárással azonosított vegyületek a találmány oltalmi körébe tartoznak. Az ilyen vegyületek előnyösen kis molekulatömegű, peptid vagy nem peptid jellegű molekulák. Kis méretüknek köszönhetően a vegyületek a gyakorlatban sokkal jobban alkalmazhatók gyógyászati célokra, mint az angiosztatin. Ezeket a molekulákat és felhasználásukat az alábbiakban részletesebben is ismertetjük.

A találmány szerinti proteineket és peptideket előállíthatjuk például szokásos kémiai peptidszintézisek alkalmazásával. Szilárd fázisú szintéziseket — egyebek mellett — például a következő helyen írnak le: Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, pp 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis Biology*, Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A.

Előnyösen azonban a találmány szerinti proteineket, peptideket és polipeptideket rekombináns DNS módszerrel állítjuk elő, amelynek során általában létrehozunk egy, a proteint vagy peptidet kódoló DNS szekvenciát, egy egyedi promoter kontrollja alatt behelyezzük a DNS-t egy expressziós kazettába, a proteint vagy a peptidet egy gazdaszervezetben expresszáljuk, izoláljuk

az expresszált proteint vagy peptidet, és kívánt esetben renaturáljuk a terméket. Miután expresszálódtak, a rekombináns peptideket vagy proteineket a szakterületen szokásosan alkalmazott módszerekkel tisztíthatjuk. Ennek megfelelően a találmánynak egy további tárgyát képezi egy olyan vektor, például egy vírus vagy egy plazmid, amely egy találmány szerinti nukleinsavat tartalmaz. A találmány kiterjed továbbá a találmány szerinti proteint vagy peptidet expresszáló vektorral transzformált vagy transzfektált rekombináns sejtekre, valamint az alábbiakban részletesen ismertetett találmány szerinti antitestet expresszáló rekombináns sejtekre is. A találmány szerinti peptideket és proteineket kódoló vektorokat felhasználhatjuk az olyan molekulák expresszáására, amelyek immunogénként szolgálnak az antitesttermeléshez. A találmány szerinti vektorokat ezenkívül felhasználhatjuk sejtek *in vitro* és *in vivo* transzformálására is a találmány szerinti peptidek és proteinek expresszáálásához. A találmány szerinti nukleinsavak egyikét, például az 1. számú szekvencia által meghatározott gént expresszáló sejteket, amelyek ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartoznak, rendkívül sokféle módon hasznosíthatjuk. Az ilyen sejtek eukarióták vagy prokarióták lehetnek.

A találmány szerinti proteineket és peptideket felhasználhatjuk antigénekként a saját magukkal szembeni antitestek kialakítására. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezik olyan antitestek is, amelyek specifikusan kötődnek a találmány szerinti peptidekhez. Ezek az antitestek immunvizsgálatokban (immunoassay), például peptidek és polipeptidek izolálására

szolgáló immunvizsgálatokban hasznosíthatók. A találmány szerinti peptideket ezenkívül felhasználhatjuk olyan vizsgálatokban is, amilyenek például az amplifikáció specifikus vizsgálatok, az immunológiai vizsgálatok stb.

A találmány szerinti antitestek monoklonális és poliklonális antitestek lehetnek, és magukban foglalják az egyedi, alél, törzs és species variánsokat vagy ezek fragmentumait, mind a természetes előfordulású (teljes hosszúságú) formákban, mind pedig rekombináns formákban. Ezenkívül a találmány szerinti peptidekkel vagy polipeptidekkel szemben az antitestek natív konfigurációjukban vagy nem-natív konfigurációikban képződhetnek. Anti-idiotipikus antitestek is kialakulhatnak. Az ezen a területen jártas szakember számos eljárást ismer antitestek előállítására. Monoklonális antitestek előállítási módszereire nézve lásd például: Stites et al. (eds.), *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, California, USA. A fágokban vagy hasonló vektorokban lévő rekombináns antitestek könyvtárainak szelekcióját magukban foglaló módszerekre nézve lásd például: Huse et al., *SCIENCE*, 246, 1275-1281 (1989).

A találmány szerinti molekulákat gyógyszerkészítményekben, különösen az angiogenezissel kapcsolatos rendellenességek kezelésére és/vagy megelőzésére szolgáló gyógyszerkészítményekben is. Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi egy gyógyszerként történő felhasználásra szolgáló találmány szerinti peptid, polipeptid, protein vagy antitest, valamint az említett molekulák alkalmazása angiogenezissel kapcsolatos betegségekre

vagy rendellenességekre irányuló gyógyszerkészítmények előállítására. A találmány tárgyát képezi egy olyan gyógyszerkészítmény is, amely egy gyógyászatilag elfogadható hordozóval együtt egy találmány szerinti molekulát tartalmaz. A gyógyszerként alkalmazott találmány szerinti molekula a fentiekben ismertetett peptidek, polipeptidek, proteinek vagy antitestek bármelyike lehet, valamint ilyen molekula lehet a fentiekben ismertetett szkrínelési eljárás alkalmazásával azonosított bármely új anyag is.

A találmány szerinti molekulák legelőnyösebb alkalmazását az olyan vizsgálatokban történő felhasználás jelenti, amelyekben új anyagokat szkrínelünk. Olyan vegyületeket azonosíthatunk, amelyek az angiosztatinéhoz és/vagy az 5. Kringle-éhez hasonló angiogén hatásokat mutatnak, de amelyek kisebbek, hatékonyabbak és előnyösen hosszabb élettartamúak az emberi vagy állati testben, mint az angiosztatin. A rövidebb élettartam annak tudható be, hogy a vegyületek kevésbé hajlamosak a proteázok általi degradációra. Egy szerves vegyület tervezésekor „íránymutató” („lead”) vegyületként alkalmazhatunk egy találmány szerinti molekulát. Az ismert gyógyszerészetiileg aktív vegyületek mimetikumainak a tervezése jól ismert módszer az ilyen „íránymutató” vegyületeken alapuló gyógyszerfejlesztésben. A mimetikumok tervezése, szintézise és tesztelése általánosan alkalmazott módszer annak érdekében, hogy egy célul kitűzött tulajdonság eléréséhez elkerülhető legyen túl sok molekula véletlenszerű szkrínelése.

Az új molekulákat előnyösen gyógyszerekként alkalmazzuk,

amely gyógyszereket sokkal kisebb dózisokban adhatunk be, mint az angiosztatint, és amelyeket lényegesen ritkábban, például 14 naponként egyszer adhatunk be (összehasonlítva: az angiosztatin élettartama ennek az időnek körülbelül az egy tizede). Az egyik előnyös megoldás értelmében a találmány szerinti szkrinelési eljárással azonosított új molekulák kis molekulatömegű szerves molekulák, amelyek esetében orális beadásra alkalmas gyógyszerkészítményeket, például tablettákat állíthatunk elő a vegyületekből.

A találmány szerinti gyógyszerkészítményeket azonban előállíthatjuk bármilyen, például orális, intravénás, kután vagy szubkután, nazális, intramuszkuláris vagy intraperitonealis beadásra alkalmas formában is. A hordozó vagy az egyéb összetevők jellegét a beadás konkrét módja határozza meg. [Az ezzel kapcsolatos módszerek és előírások — egyebek mellett — például a következő helyen találhatók meg: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.), 1980].

Az említett kis molekulatömegű vegyületek dózisát a kezelendő betegség vagy állapot, valamint más klinikai faktorok szabják meg, amilyen például az ember vagy az állat testtömege és állapota, illetve a vegyület beadásának a módja. Emberek és állatok kezelése esetén a vegyületet körülbelül 0,5 mg/testtömeg-kg és 500 mg/testtömeg-kg közötti dózisban adhatjuk be.

A találmány szerinti vegyületeket és eljárásokat előnyösen alkalmazhatjuk az angiogenezissel kapcsolatos rendellenességek és/vagy betegségek valamennyi típusa esetén, amilyenek — egyebek mellett — például a következők: tumoros állapotok, diabe-

tes, rheumatoid arthritis, továbbá bizonyos gyulladásos állapotok, például psoriasis, a belek krónikus gyulladásai, asztma stb. A vegyületeket valószínűleg felhasználhatjuk az obesitas kezelésére és gyógyítására, illetve megelőzésére is.

Az egyik egyedi megoldás értelmében a találmány szerinti molekulákat a génterápiában hasznosítjuk. A génterápiás eljárások egyik áttekintő összefoglalását például a következő helyen olvashatjuk: Anderson, SCIENCE, 256, 808-813 (1992).

A jelen találmánynak egy további előnyös alkalmazása lehet a testben lévő angiosztatin és/vagy 5. Kringle receptor szignalizációjának szabályozására szolgáló eljárások kifejlesztése. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás angiogenezissel kapcsolatos betegség vagy rendellenesség kezelésére, valamint egy eljárás az ilyen állapotok megelőzésére.

KÍSÉRLETI RÉSZ

Az alábbiakban a mellékelt ábrákra hivatkozva részletebben ismertetjük a találmányt.

Az angiosztatin endothelialis sejtekhez történő kötődésének a bizonyítása

Az angiosztatin és a VEGF és bFGF angiogén faktorok közötti kompetitív kötési vizsgálattal kimutattuk, hogy az angiosztatin nem befolyásolja ezeknek a molekuláknak a ligand-receptor kölcsönhatását. Azonos mennyiségű kötést detektáltunk jelzetlen angiosztatin jelenlétében, illetve hiányában. Így megállapítható, hogy az angiosztatin blokkolja az angiogén faktorok és az endothelialis sejtek közötti kölcsönhatást.

Az angiosztatinnak és prekursor plazminogénjének a közvetlen kötését jódozott proteinek alkalmazásával végzett kötési vizsgálatokkal tanulmányoztuk, illetve analizáltuk a borjú mikropilláris endothelialis sejtekkel történő kölcsönhatásukat (lásd az 1. ábrát).

Közelebbről, humán angiosztatint (1-4. Kringle domén) vagy plazminogént a gyártó (Pierce Inc.) előírásai szerinti jodogén eljárás útján 125-ös jódizotóppal megjelöltünk. A jelzett proteint ezt követően G50 Sepharose oszlopon (Pharmacia Inc.) tisztítottuk. A fajlagos aktivitást 90 000 cpm/ng protein értékben állapítottuk meg. A kötési vizsgálatokhoz 12 vájatú lemezekben borjú kapilláris endothelialis sejteket növesztetünk konfluenssé válásig. A sejteket 1 mg/ml bovin-szérumalbumint (BSA) tartalmazó PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejteket 10

ng/ml radioizotóppal jelzett angiosztatinnal vagy plazminogén-nel inkubáltuk. A kötést a jelzetlen ligand növekvő koncentrációival versenyeztettük. A sejteket két órán keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 1 mg/ml bovin-szérumalbumin (BSA) tartalmazó PBS-sel ötször mostuk. A sejteket PBS-sel készített 1 %-os Triton X100-zal lizáltuk, majd egy gamma-számlálóban mértük a radioaktivitást. A disszociációs állandót és a receptorok számát a RBINDING program [van Zoelen E., J. ANAL. BIOCHEM., 200 (2), 393-399 (1992)] alkalmazásával nyertük.

**Az angiosztatin-kötő molekulák azonosítása az élesztő
kéthibrides rendszer alkalmazásával**

Az angiosztatin még redukció után is megtartja az aktivitását, ami arra utal, hogy a háromdimenziós hajtogatottság nem létfontosságú a kötéshez és az aktivitáshoz. Ez előnyös a szkrínelési eljárások szempontjából, amelyekben nagyszámú klón szkrínelhető akkor is, ha a protein visszahajtogatása nem teljesen pontos.

Az élesztő kéthibrides rendszert alkalmaztuk azoknak a molekuláknak a szkrínelésére, amelyek hozzákötődnek a plazminogén 1-4. Kringle doménjéhez. A további magyarázat során a 2. ábrára hivatkozunk. Egy humán placentából származó kéthibrides cDNS könyvtárból (Stratagene) körülbelül 2×10^6 klónt szkríneltünk. A pozitív klónokat az alábbiaknak megfelelően azonosítottuk.

(1) A szelektív körülmények közötti (His, Leu és Trp) szkrínelés 37 pozitív klónt generált a CG1945 élesztő törzsben.

(2) Az ONPG-vel (SIGMA) 30 °C-on 2 órán keresztül végzett

inkubálás után a 37-ből hét mutatott nagy β -galaktozidáz aktivitást.

(3) A nagy β -gal aktivitást mutató hét kolóniából megtisztítottuk a DNS-t, majd Y190 élesztő törzsbe retranszfektáltuk. A hét kolóniából három magtartotta az aktivitást az új élesztő törzsben is. Ezeknek a klónoknak a szekvenciaanalízise kimutatta, hogy a klónok ugyanazon génből származnak.

(4) Az 50 mM 3-amino-triazol jelenlétében növekedést (3. ábra), valamint a β -gal aktivitást (lásd az alábbi táblázatot) Big 3-ban értékeltük, majd összehasonlítottuk a pozitív és negatív kontrollokkal.

Kötő domén	Aktivációs domén	β -Gal aktivitás
angiosztatin + kötő domén	BIG3 - aktivációs domén	15 u
angiosztatin + kötő domén	aktivációs domén önmagában	< 0,04 u
Kötő domén önmagában	BIG3 - aktivációs domén	0,07 u
p53 + kötő domén	Big3 - aktivációs domén	0,05 u
p53 + kötő domén	SV40LT - aktivációs domén	90 u

A Big3 (angiosztatin-kötő domén) szekvenciája

A Big3 klónnak egy placenta kéthibrides könyvtárból (Stratagene, Inc.) történő izolálása után a pGAD aktivációs doménből nyert cDNS inszertumot GAL4 AD szekventáló primerekkel közvetlenül szekventáltuk. A cDNS inszertumot adaptorokból nyert EcoR1 helyek alkalmazásával pUC18 vektorba visszaklónoztuk, majd univerzális és reverz primerekkel megismételtük a szekventálást. A szekvenciákat egy ALF automata szekventorban (Pharmacia) analizáltuk. A Big3 szekvenciáját a 4. számú szekvencia (SEQ. ID NO. 4) mutatja be.

A Big3 és a Big3-GST fúziós protein expresszálása és tisztítása

A Big3 szekvenciát *Schistosoma japonicum*-ból nyert glutathion S-transzferáz (GST) doménnel alkotott fúziós proteinként *E. coli*-ban expresszáltuk.

• Vektor konstrukció

pUC18-Big3 plazmid templátként törtpnő alkalmazásával végzett PCR amplifikációval Big3 fragmentumot (429 bp) nyertünk. A primer szekvenciák a következők voltak:

BamHI-NH₂ 5' TAC GGA TCC GAA TCG AAC AAA ACT GCA GCT G 3' [5. számú szekvencia (SEQ ID NO. 5)]

XhoI-COOH 5' ATA CTC GAG TCA TGG AGC TGG AGT TGG AGC CA 3' [6. számú szekvencia (SEQ ID NO. 6)]

Az alkalmazott ciklus protokoll az alábbi volt:

94 °C 3', 60 °C 1', 72 °C 1'	1 ciklus
94 °C 30", 60 °C 1', 72 °C 2'	30 ciklus
94 °C 30", 60 °C 1', 72 °C 5'	1 ciklus

Taq polimeráz: natív Pfu DNS polimeráz (Stratagene).

A PCR fragmentumot BamHI és XhoI alkalmazásával emésztettük, tisztítottuk és ugyanezen restriktációs enzimekkel emésztett PGEX-6P-2 plazmidhoz (Pharmacia Biotech) kapcsoltuk. A kapcsolási keveréket használtuk az XL1-kék (XL1-Blue) sejtek (Stratagene) transzformálására. A rekombináns plazmidokat restriktációs analízissel és automatizált szekventálással ellenőriztük.

• *Expresszálas és tisztítás*

DH5 α sejteket (Clontech) az egyik ellenőrzött klónnal (pGEX-Big3) transzformáltunk, majd 6 órán keresztül szobahőmérsékleten 0,1 mM IPTG-vel indukáltunk.

A fermentációs levest 15 percen keresztül 4000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, majd a sejttöledéket 10 tömeg/térfogat%-os lízis-pufferben (50 mM TRIS·HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 20 mM DTT, 1 mM EDTA, proteáz inhibitor keverék) szuszpendáltuk, majd ultrahanggal lizáltuk. A teljes lizátumot 4 °C-on 20 percen keresztül 15 000 $\times$ g érték mellett centrifugáltuk. A tiszta felülúszót lízis-pufferrel előzetesen ekvilibrált Glutathione-Sepharose oszlopra vittük (1 ml oszloptöltet 20 ml lizátumhoz). A gyantát 10 oszloptérfogatnyi (CV) lízis-pufferrel mostuk, majd a fúziós proteint 3 CV elúciós pufferrel (100 mM TRIS·HCl pH 8,0, 20 mM redukált glutation) eluáltuk.

A GST-Big3 proteint úgy hasíthatjuk, hogy a glutation-Sepharose kötött fúziós proteint 20 μ l/ml PreScission proteáz gyantával inkubáljuk PS pufferben (50 mM TRIS·HCl pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF).

Az eluált proteinek az rp-HPLC-ben (0,1 térfogat% triflu-

or-ecetsavat tartalmazó 10:90 → 90:10 térfogatarányú acetonitril/víz oldószergradiens) egyetlen csúcsot eredményeztek, megfelelően a tömeganalízis (elektronszórás) alapján várt molekulaméretnek és a korrekt NH₂ szekvenciának. Az SDS-PAGE során 80 kD látszólagos molekulatömegnél egy szennyeződés mutatkozott; ez az anyag a bakteriális chaperon DnaK-nak bizonyult, amit HiTrapQ oszlopon végzett ioncserés kromatográfiával eliminálhattunk.

A fermentáció 1 literéből körülbelül 10 mg GST-Big3 fúziós proteint és körülbelül 3 mg hasított Big3-at nyertünk.

A rekombináns GST-jelzésű Big3 in vitro kötődése

angiosztatinhoz

A kötéshez alkalmazott protokollt az alábbiakban ismertetjük.

A pGEX-Big3 transzformáns egy kolóniáját ampicillint tartalmazó 10 ml LB médiumba inokuláltuk, majd egy éjszakán keresztül 37 °C-on növesztettük.

Az egyéjszakás tenyészetet 100 ml friss médiummal 1:10 arányban meghígítottuk, ezt követően egyórás 37 °C-on végzett inkubálás után 0,5 mM végkoncentrációban IPTG-t adtunk hozzá, majd 3-7 órán át folytattuk az inkubálást.

A tenyészetet ezt követően 10 percen keresztül 5000 g értékkel centrifugáltuk, az üledéket 3-5 ml jéghideg PBS-ben szuszpendáltuk, majd a sejteket ultrahanggal lizáltuk. A keverékhez 0,5-1 % végkoncentrációban Triton X100-at adtunk, majd a szuszpenzió 1,5 ml-es részleteit 10 percen keresztül 14 000

fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk.

A felülúszóhoz hozzáadtunk 0,1-0,3 ml 50 %-os glutation-agarózyöngy szuszpenziót, majd a keveréket 4 °C-on 3-5 órán keresztül kevertettük. Ezt követően a gyöngyöket centrifugálásal elkülönítettük, majd jéghideg PBS-sel ötször, ezt követően pedig kötési oldattal (B.S.; 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) kétszer mostuk.

Kötési vizsgálat: 0,7 ml B.S.-t, 0,1 % borjúsérumot és 500 ng angiosztatint 4 °C-on 1-3 órán keresztül 30-50 µl 50 %-os Big3-immobilizált glutation-agarózyöngy szuszpenzióval kevertettünk.

A gyantát 5-7-szer jéghideg B.S.-sel mostuk, majd anti-humán plazminogén antitestekkel (Dako Inc.) végzett Western blot analízisben alkalmaztuk.

A 4. ábra azt mutatja be, hogy hogyan köti meg *in vitro* a tisztított rekombináns Big 3 az angiosztatint. Érdekes módon a plazminogén kötése is detektálható, de csak azt követően, hogy DTT-vel reagáltatva a diszulfid-kötéseket redukáltuk.

A teljes hosszúságú szekvencia klónozása

Az 5. ábra az ABP-1 teljes hosszúságú szekvenciájának a klónozását mutatja be. A teljes gént úgy klónoztuk, hogy egy placenta cDNS fág könyvtárat humán köldökvénór endothelialis sejtekből nyert mRNS alkalmazásával, 5' RACE PCR-rel (Gibco) együtt egy Big3 próbával (amelyből az ismétlődő szekvenciákat eltávolítottuk) szkríneltünk. A cDNS klón teljes szekvenciáját az 1. számú szekvencia (SEQ ID NO. 1) ismerteti, míg a kódolt

protein a 2. számú szekvenciában (SEQ ID NO. 2) látható. A kísérleti protokoll részletei az alábbiak.

A Big 3-nak egy *HinfI* fragmentumának próbaként történő alkalmazásával egy placenta lambda fág könyvtár (Stratagene, Inc.) 10 millió klónját szkríneltük. Szokásos módon (Sambrook et al., 1989) DNS izolációs és Southern blot eljárást hajtottunk végre. % olyan klónt izoláltunk, amelyek szekvenciája átfedésben van a Big3-mal (7-1, 7-2, 8-2, 9-3, 9-5). A 7-2 klón 5'-szekvenciáját használtuk az 5'RACE PCR (Gibco Life Technologies, Inc.) génspecifikus primerjeinek (GSP) a megtervezéséhez. Az 5'-szekvenciák azonosításához humán köldökzsinór endothelialis sejtekből izolált mRNS-t használtunk.

Az első RACE PCR esetén alkalmazott primerek:

Primerek: GSP1-(5'→3') GCTGACAGTTGCCCTGACGCTGCT [10. számú szekvencia (SEQ ID NO. 10)]

GSP2-(5'→3') CGGAGACGGTGCTCTAGCTGCTCA [11. számú szekvencia (SEQ ID NO. 11)]

GSP3-(5'→3') TCCTTCCAACCTCTGCCTCAAGTTCCG [12. számú szekvencia (SEQ ID NO. 12)]

RACE eljárásokat alkalmaztunk a GSP2 és GSP3, valamint az ABP-1 mRNS 5'-vég közötti ismeretlen szekvenciák amplifikálására és klónozására. Ezt a szekvenciát alkalmaztuk ezt követően a RACE PCR következő csoportja esetén az új primerek megtervezéséhez:

Primerek: GSP1-(5'→3') GGTGGCAGCGGACAGGCAGGATAC [13. számú szekvencia (SEQ ID NO. 13)]

GSP2-(5'→3') GAGGCGGAGAGAACTAAGAGAAGA [14. számú

szekvencia (SEQ ID NO. 14)]

GSP3-(5'→3') GAGCGGAGATGGAGGAGTAATTCA [15. számú

szekvencia (SEQ ID NO. 15)]

Az átfedő szekvenciákkal rendelkező A2-2, A2-1 és A1-C klónokat izoláltuk. Az A2-1 szekvenciát alkalmaztuk próbaként a placenta fág könyvtár második szkríneléséhez. Ebből a szkrínelésből további két (7-10 és 6-5) klónt izoláltunk. Amint az a 6. ábrán látható, a hat lehetséges keretből a 2. keret az egyetlen, amely teljes szabadon olvasható keretet hozva létre egy 675 aminosavcsoportból álló valódi proteint eredményez.

mRNS expressziós jellemzők

Az ABP-1 esetén próbaként kereskedelembe kapható (Clontech, Inc.) többszörös humán felnőtt és magzati szövet (#7760-1 és #7756-1) mRNS blot-ot (2 mg mRNS/vájat) alkalmaztunk. A blot-okat a gyártó előírásainak megfelelően az ExpressHyb hibridizációs oldattal (Clontech, Inc.) hibridizáltuk. A blot-okat a 7-2 5'PstI fragmentummal próbáltuk. A 7. ábra mutatja be a kísérlet eredményeit; a méretek: 9,5 és 7,5 kb.

ABP-1-et humán köldökszínór, borjú aorta és borjú mikrokapilláris endothelialis sejtekben is észleltünk. Az EaHy926 immortalizált endothelialis sejtvonalban és humán magzati fibroblasztokban csak csekély expressziót detektáltunk vagy nem észleltünk expressziót. A sejtvonalak egyike sem reagált az angiosztatinra, illetve a sejtvonalak egyike sem mutatott kötődést a FITC-jelzett angiosztatinnal.

Valós idejű RT-PCR

Az 5' nukleáz vizsgálat (TaqMan vizsgálat) egy nem kiterjeszthető oligonukleotid hibridizációs próbát (TaqMan próba) alkalmaz. A TaqMan próba egy 5'-riporter színezéssel és egy 3'-leállító színezéssel rendelkező oligonukleotidból áll. Amennyiben a próba intakt, a riporter színezéknek a leállító színezékhez viszonyított közelsége a riporter fluoreszcencia szuppresszióját eredményezi, elsődlegesen egy Foster-típusú energiaátmenet útján. A PCR során előre irányuló és reverz primerek a target DNS-nek egy specifikus szekvenciájává hibridizálódnak. A TaqMan próba egy, a PCR termékben lévő target szekvenciává hibridizálódik. A Taq polimeráz a TaqMan próbát az 5'-3' nukleáz aktivitásával hasítja. A hasítás során a riporter színezék és a leállító színezék elkülönül, amelynek eredményeként nő a riporter gén fluoreszcenciája.

Valós idejű RT-PCR analízis

RNS előállítás

Az Ultraspec RNS izoláló rendszer (Biotex) alkalmazásával az alábbiakban felsorolt szövetekből és sejtekből teljes RNS-t izoláltunk és tisztítottunk.

HDMEC/2	h. dermalis microvascularis EC	poli A+
A2780	h. petefészek karcinóma	TELJES
A375	h. melanoma	TELJES
HDF	h. dermalis fibroblastok	TELJES
HEL4	h. cervix carcinoma	TELJES
DU145	h. prostata carcinoma	TELJES
HUVEC	h. köldökvéna EC	TELJES
ECV304	immortalizált EC	TELJES
CEM	h. akut lymphobl. leuk.	TELJES
K562	h. erythroleukemia	TELJES
JURKAT	h. akut T-sejt leukémia	TELJES
THP-1	h. monocyta (akut leu)	TELJES
EaHy926	h. dermalis sejtek	TELJES
S35/K9	humán vastagbélrák	TELJES
agy	humán normál szövet	TELJES
vastagbél	humán normál szövet	TELJES
prosztata	humán normál szövet	TELJES
vázizom	humán normál szövet	TELJES
uterus	humán normál szövet	TELJES
placenta	humán normál szövet	TELJES

cDNS szintézis

Az RT reakciót RT primereként Random hexamerekkel, TaqMan Reverse Transcription Reagent (PE Applied Biosystems) alkalmazásával hajtottuk végre. A reverz transzkripció lépésben a reakció-térfogat 100 μ l, a teljes RNS mennyiség pedig mintánként 1 μ g volt.

Az RT-t a következő ciklus paraméterek alkalmazásával hajtottuk végre:

10' 25 °C-on

45' 48 °C-on

5' 95 °C-on

PCR reakció

Egy elsődleges koncentráció optimalizálás után a PCR reakciót 10 ng cDNS-en, TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) és a következő oligonukleotidok alkalmazásával hajtottuk végre:

- ABP-1 előre mutató primer: 5' GTTTGACCTGCAATCCAGACAA 3' [7. számú szekvencia (SEQ ID NO. 7)]; végkoncentráció: 300 nM

- ABP-1 reverz primer: 5' CCCAGGATCTGAATGGGAGTT 3' [8. számú szekvencia (SEQ ID NO. 8)]; végkoncentráció: 900 nM

- ABP-1 TaqMan próba:
5' (FAM színezék)-CAGATGGGCCTGTGTTCCACTCCAA-(TAMRA színezék) 3' [9. számú szekvencia (SEQ ID NO. 9)]; próba végkoncentráció: 200 nM

Az alkalmazott ciklus protokoll az alábbi volt:

2' 50 °C-on; 10' 95 °C-on 1 ciklus

15" 95 °C-on; 1' 60 °C-on 40 ciklus

A génexpresszió relatív mértéke

Az összehasonlító eljárás egy olyan aritmetikai képletet használ a relatív mennyiségek eredményeinek a kiszámításához, ami nem igényli standard görbék alkalmazását.

A 8. ábrán látható eredmény azt jelzi, hogy egy X. minta a Kalibrátorhoz képest hányszorosán expresszálja a targetet. A Kalibrátor az a minta, amelyik a legkisebb mértékben expresszálja a targetet. Ebben a kísérletben az EaHY926 mintát választottuk kalibrátornak.

Big3-mal szembeni antitestek

New Zealand White nyulak immunizálásához 100 mikrogramm Big3-GST fúziós proteint feloldottunk 1 ml foszfát-pufferelt fiziológiás nátrium-klorid-oldatban (PBS), ahol az oldatát 1 ml Freund-féle komplett adjuvánssal (Gibco) homogenizáltuk. Az így nyert emulziót a 0. napon szubkután injekcióval adtuk be, majd a kezelést a 15. és a 28. napon megismételtük. A 35. napon el-távolítottuk a vért a nyulakból, a vért egy éjszakán keresztül 4 °C-on hagytuk megalvadni, majd az így nyert szérumot -20 °C-on tároltuk.

A specifikus antitestek tisztításához az alábbiaknak megfelelően gyanta-immobilizált ligandot állítottunk elő: Big3 polipeptidet 2 ml össztérfogatban 5 mg/ml koncentrációra hígítottunk (0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát, 0,5 M nátrium-klorid, pH 8,3). A keveréket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten 2 ml cianogén-bromiddal aktivált Sepharose CL-4B gyantával (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, Amerikai Egyesült Államok)

reagáltattuk. A reakció után a gyantát három alkalommal 10-szeres térfogatú 100 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5 oldattal mostuk. Az immunszérumot 2 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk az affinitás gyantával, majd a gyantát egy 5 ml-es üveg kromatográfiás oszlopban (Bio-Rad, Richmond, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) 25-szörös térfogatú 100 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5 oldattal mostuk. A specifikus antitesteket 100 mM glicin/HCl, pH 2,8 oldat 1 ml-es részleteivel eluáltuk. Az antitest-elúciót a 280 nm-nél mért optikai sűrűség (OD280) mérésével követtük nyomon. Az 1-nél nagyobb optikai sűrűségű frakciókat egyesítettük, 36 órán keresztül 4 °C-on 1 liter PBS-sel szemben dializáltuk (Slide-A-lyzer kazetták, Pierce), amelynek során a puffert háromszor cseréltük.

Az angiosztatinnak az ABP-1 proteinen keresztül történő kötése és szignalizálása

A 9A. és a 9B. ábra a FITC-jelzett angiosztatin és a vektor kontrollal transzfektált HeLa és EaHy926 sejtekkel transzfektált ABP-1 közötti kötési adatokat mutatja be. A 9A. ábra a zöld fluoreszcens proteinhez (GFP) kapcsolt ABP-1 celluláris lokalizációját mutatja átmenetileg transzfektált sejtekben. A protein az endoplazmatikus retikulumban és a sejtmembránban detektálható. A DABP-1 a gén 5'-végében egy 500 bp-s deléciót tartalmaz, ami megszünteti az ABP-1 korábbiakban ismertetett lokalizációját.

A 9B. ábrán ABP-1 GFP-vel transzfektált HeLa sejtek láthatók. A 2,5 mg angiosztatinnal 60 percen keresztül 0 °C-on vég-

zett inkubálás, majd az ezt követően 15 percen át 37 °C-on végzett inkubálás kiváltja az ABP-1 GFP internalizálódását.

A 9C. ábra az angiosztatinnak az ABP-1-hez történő kötődését mutatja be. Kimutattuk, hogy a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelzett angiosztatin specifikusan az endothelialis sejtekhez kötődik (az adatok nem láthatók). HeLa sejteket az ABP-1 expressziós konstrukcióval vagy a vektor kontrollal (p RC/CMV, In Vitrogen, Inc.) transzfektáltunk. Élő HeLa sejteket 10 % magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM-ben 60 percen keresztül 0 °C-on FITC-jelzett angiosztatinnal (10 µg/ml) inkubáltunk. A kötött angiosztatin aggregálódásához a sejteket ezt követően 15 percen át 37 °C-on inkubáltuk. A kötést fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk. Az angiosztatin kötését az ABP-1 transzfektált sejtekben detektáltuk, a vektor kontrollban azonban nem észleltük.

A 9D. ábra az F-aktinnal szemben rodamin-jelzett falloidinnel végzett festéssel együtt az ABP-1 immunofestését mutatja humán köldökzsínór endothelialis (HUVE) sejtekben.

• *Immunfestési protokoll*

HUVE sejteket 4 %-os formaldehidben fixáltunk, PBS-sel mostunk, majd 5 % lószérumban preblokkoltunk. A blokkoló oldatot eltávolítottuk, majd 5 % lószérumban az angiosztatin-kötő Big3 doménnel szembeni nyúl poliklonális antitestekkel helyettesítettük. A pozitív festést egy fluoreszcens-jelzett szekunder antitesttel (Dako, Inc.) tettük láthatóvá. Ezzel egyidejűleg a szekunder antitesttel (1 % Triton X100-zal 1 percen keresztül végzett permeabilizálás után) rodamin-konjugált falloidin-

dint (Molecular Probes, Inc.) is megfestettünk. Negatív kontrollként a zöld fluoreszcens proteinnel szemben nyúl poliklonális antitesteket alkalmaztuk. Humán fibroblasztokban nem észleltünk pozitív festést.

Amint az a 9D. ábrán látható, az ABP-1 fokális adhéziókban és membránfodrokban lokalizált (nyilak).

In vitro kináz adatok

5 cm-es Petri-csészékben HUVE sejteket szubkonfluenssé válásig tenyésztettünk. Másnap eltérő időpontokban 2,5 mg/ml angiosztatint adtunk a sejtekhez. Valamennyi lemezről, beleértve a kontrollokat is, egyidejűleg nyertük ki a sejteket. A sejteket jéghideg PBS-ben öblítettük, majd 1 ml lízis pufferben inkubáltuk. A sejteket átvittük egy Eppendorf-csőbe, majd 4 °C-on 5 percen keresztül 14 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A felülúszót átvittük egy másik Eppendorf-csőbe, majd hozzáadtunk 2 µg Big3 nyúl poliklonális antitestet. A mintákat 60 percen át 4 °C-on inkubáltuk, ezt követően hozzáadtunk 50 µl protein A Sepharose (Pharmacia, Inc.) szuszpenziót, majd egy forgó inkubátorban további 60 percen keresztül inkubáltuk. Az immunoprecipitátumot rövid centrifugálással kinyertük, lízis pufferben kétszer, mosó pufferben egyszer és kináz pufferben ugyancsak egyszer mostuk. A visszamaradt puffert fecskendővel eltávolítottuk. Minden egyes csőbe bemértünk 1 µCi gammaATP-vel (Amersham, Inc.) együtt 25 µl kináz puffert. A mintákat 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 2xSDS PAGE minta puffer hozzáadásával állítottuk le. A mintákat dena-

turáló körülmények között forraltuk, ezt követően pedig SDS PAGE útján analizáltuk.

A 10. ábrán látható adatok azt mutatják, hogy az angiosztatin hozzáadása 30 percen belül leszabályozza az ABP-1-hez társuló kináz aktivitást. Ez annak a közvetlen bizonyítéka, hogy az angiosztatin hatást gyakorol az ABP-1 által mediált szignalizációs folyamatokra.

Az ABP-1 mediálja az angiosztatin-indukált fokális adhéziónak a kináz aktivitást

A 11. ábrán látható adatok azt mutatják, hogy 2,5 µg/ml angiosztatin hozzáadása a hozzáadás utáni egy órán belül megemeli a FAK aktivitást.

5 cm-es Petri-csészékben EaHy926 sejteket szubkonfluenssé válásig tenyésztettünk. Másnap eltérő időpontokban 2,5 mg/ml angiosztatint adtunk a sejtekhez. Valamennyi lemezről, beleértve a kontrollokat is, egyidejűleg nyertük ki a sejteket. A sejteket jéghideg PBS-ben öblítettük, majd 1 ml lízis pufferben inkubáltuk. A sejteket átvittük egy Eppendorf-csőbe, majd 4 °C-on 5 percen keresztül 14 000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A felülúszót átvittük egy másik Eppendorf-csőbe, majd hozzáadtunk 1 µg FAK monoklonális antitestet (Transduction Lab. Inc.). A mintákat 60 percen át 4 °C-on inkubáltuk, ezt követően hozzáadtunk nyúl anti-egér IgG + 50 µl protein A Sepharose (Pharmacia, Inc.) szuszpenziót, majd egy forgó inkubátorban további 60 percen keresztül inkubáltuk. Az immunoprecipitátumot rövid centrifugálással kinyertük, lízis pufferben kétszer, mosó

pufferben egyszer és kináz pufferben ugyancsak egyszer mostuk. A visszamaradt puffert fecskendővel eltávolítottuk. Minden egyes csőbe bemértünk 1 μ Ci gammaATP-vel (Amersham, Inc.) együtt 25 μ l kináz puffert. A mintákat 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 2xSDS PAGE minta puffer hozzáadásával állítottuk le. A mintákat denaturáló körülmények között forraltuk, ezt követően pedig SDS PAGE útján analizáltuk.

A 11. ábrán látható adatok azt mutatják, hogy az angiosztatin hozzáadása egy órán belül fokozza a FAK aktivitást. Megjegyzendő, hogy az EaHy926 sejtek nem expresszálnak ABP-1-et, amint azt a reverz transzkriptáz PCR analízis bizonyítja.

A szekvenciák felsorolása

<110> Pharmacia & Upjohn

<120> Angiogenesis related molecules

<130> pctpha1856

<140>

<141>

<150> SE9804372-2

<151> 1998-12-17

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6463

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (797) .. (2824)

<400> 1

ccaggagctg ccttggcagt caogccctt ccttccgagg agctttctgg ctgcctaaac 60
tggtagaccc cctgaattac tcttccatct ccgctctctt tcgcctcctc ttctcttagt 120
tctctccgcc tccccctcaa ctaccaccac ctccagtcag tctcgccctcc ggctatccgc 180
tgctccaccc tctggcccggt tctctgctt gtccgctgcc accaaggaga gcccgagcgg 240
agcagcgagg aggggagcag ccgggagttg gggcttcccc cctgcccctc cctggccgct 300
ggcccgggac cgaagccact tgagcgagca gagagtcgtc accttgctct ctttgccctc 360
agggagctgc taagaaggac aaataagata gcagagtgaag agagcttttg tctccttaga 420
aggaaggctg agaaactaaa ggccagcgca ggacatctca ttgccattgt cagccaggaa 480
ctcgagcct cacagcccta cttcttctct gacctctggg gggctcctgc ccttgctaca 540
atctccacca tccactagat tgtctctgct ccgacacctt ttgggtccaa accagggaga 600
ccattcagct cacctgcta ggccgcagca gcatttcctt cctaatacagg ctcaccaggg 660
ggatcattac cgtctctccc aacctggcct gaggcagcag cagcagcaac agcagcagca 720

gcaccatcat caccatcacc accaacaaca gcagcagcag cagccacagc agcagccagg 780

agaagcctat tcagct atg cct cgg gct cag cca tcc tct gct tct tat cag 832
Met Pro Arg Ala Gln Pro Ser Ser Ala Ser Tyr Gln
1 5 10

cca gtg cca gca gac cct ttt gcc att gtt tcc aga gcc cag cag atg 880
Pro Val Pro Ala Asp Pro Phe Ala Ile Val Ser Arg Ala Gln Gln Met
15 20 25

gtt gag atc ctc tca gac gag aac cgg aac ttg agg caa gag ttg gaa 928
Val Glu Ile Leu Ser Asp Glu Asn Arg Asn Leu Arg Gln Glu Leu Glu
30 35 40

gga tgc tat gag aag gtg gca aga ctg cag aag gtg gag aca gaa atc 976
Gly Cys Tyr Glu Lys Val Ala Arg Leu Gln Lys Val Glu Thr Glu Ile
45 50 55 60

cag cgc gtc tcg gag gca tat gag aac ctc gtg aag tca tcc tcc aaa 1024
Gln Arg Val Ser Glu Ala Tyr Glu Asn Leu Val Lys Ser Ser Ser Lys
65 70 75

aga gag gcc cta gag aaa gcc atg aga aac aag cta gag ggc gag att 1072
Arg Glu Ala Leu Glu Lys Ala Met Arg Asn Lys Leu Glu Gly Glu Ile
80 85 90

cgg agg atg cat gat ttc aac agg gat ctg aga gag cgt cta gag act 1120
Arg Arg Met His Asp Phe Asn Arg Asp Leu Arg Glu Arg Leu Glu Thr
95 100 105

gcc aac aag cag ctt gca gag aag gaa tat gag ggg tca gag gac acc 1168
Ala Asn Lys Gln Leu Ala Glu Lys Glu Tyr Glu Gly Ser Glu Asp Thr
110 115 120

aga aaa acc atc tcg cag ctc ttt gca aaa aat aaa gaa agc cag cgt 1216
Arg Lys Thr Ile Ser Gln Leu Phe Ala Lys Asn Lys Glu Ser Gln Arg
125 130 135 140

gag aag gag aag ctg gaa gcg gag ctg gcc act gcc cgt tct acc aat 1264
Glu Lys Glu Lys Leu Glu Ala Glu Leu Ala Thr Ala Arg Ser Thr Asn
145 150 155

gag gac caa aga cga cac atc gaa atc cga gat cag gcc ctg agt aat 1312
Glu Asp Gln Arg Arg His Ile Glu Ile Arg Asp Gln Ala Leu Ser Asn
160 165 170

gcc cag gcc aag gtg gta aag ctg gaa gaa gag ctg aaa aag aag caa 1360
Ala Gln Ala Lys Val Val Lys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Lys Lys Gln
175 180 185

gtg tac gtt gac aag gtg gag aag atg cag cag gcc ctt gta cag ctc	1408
Val Tyr Val Asp Lys Val Glu Lys Met Gln Gln Ala Leu Val Gln Leu	
190 195 200	
cag gca gca tgt gaa aaa cgt gag cag cta gag cac cgt ctc cgg aca	1456
Gln Ala Ala Cys Glu Lys Arg Glu Gln Leu Glu His Arg Leu Arg Thr	
205 210 215 220	
cga ctg gag agg gaa ctg gaa tcc ctg aga atc cag cag cgt cag ggc	1504
Arg Leu Glu Arg Glu Leu Glu Ser Leu Arg Ile Gln Gln Arg Gln Gly	
225 230 235	
aac tgt cag ccc acc aac gtt tca gaa tac aat gct gcc gca ctg atg	1552
Asn Cys Gln Pro Thr Asn Val Ser Glu Tyr Asn Ala Ala Ala Leu Met	
240 245 250	
gag ctc ctt cgg gag aaa gag gag agg att ctg gct ctg gaa gct gat	1600
Glu Leu Leu Arg Glu Lys Glu Glu Arg Ile Leu Ala Leu Glu Ala Asp	
255 260 265	
atg aca aag tgg gag cag aaa tat ttg gag gag aat gtg atg aga cat	1648
Met Thr Lys Trp Glu Gln Lys Tyr Leu Glu Glu Asn Val Met Arg His	
270 275 280	
ttt gct ctg gat gct gct gca act gtg gct gct cag agg gac aca aca	1696
Phe Ala Leu Asp Ala Ala Ala Thr Val Ala Ala Gln Arg Asp Thr Thr	
285 290 295 300	
gtc atc agt cac tct cct aac acc agc tat gac aca gct cta gaa gct	1744
Val Ile Ser His Ser Pro Asn Thr Ser Tyr Asp Thr Ala Leu Glu Ala	
305 310 315	
cgc atc cag aaa gag gag gaa gaa atc ttg atg gcc aat aag cgt tgc	1792
Arg Ile Gln Lys Glu Glu Glu Glu Ile Leu Met Ala Asn Lys Arg Cys	
320 325 330	
ctt gac atg gag ggc agg att aag acc ctc cat gcc cag att att gag	1840
Leu Asp Met Glu Gly Arg Ile Lys Thr Leu His Ala Gln Ile Ile Glu	
335 340 345	
aag gat gcc atg atc aaa gta ctc cag cag cgt tcc cgg aag gag ccg	1888
Lys Asp Ala Met Ile Lys Val Leu Gln Gln Arg Ser Arg Lys Glu Pro	
350 355 360	
agc aag aca gag cag ctg tcg tgc atg cgg cca gcg aag tct ctg atg	1936
Ser Lys Thr Glu Gln Leu Ser Cys Met Arg Pro Ala Lys Ser Leu Met	
365 370 375 380	
tcc att tcc aat gct gga tca ggc ttg ctc tcc cac tca tcc acc ctg	1984
Ser Ile Ser Asn Ala Gly Ser Gly Leu Leu Ser His Ser Ser Thr Leu	
385 390 395	

act ggc tcc ccc atc atg gaa gaa aag cga gac gac aag agc tgg aag	2032
Thr Gly Ser Pro Ile Met Glu Glu Lys Arg Asp Asp Lys Ser Trp Lys	
400 405 410	
ggg agc cta ggc att ctc ctg ggt gga gac tac cgt gct gaa tat gtc	2080
Gly Ser Leu Gly Ile Leu Leu Gly Gly Asp Tyr Arg Ala Glu Tyr Val	
415 420 425	
cct tcc aca ccc tcg cct gtg cca ccc tcg act ccc ctg ctc tcg gct	2128
Pro Ser Thr Pro Ser Pro Val Pro Pro Ser Thr Pro Leu Leu Ser Ala	
430 435 440	
cac tcc aag aca ggc agc cga gac tgc agt acc caa act gaa cgt ggg	2176
His Ser Lys Thr Gly Ser Arg Asp Cys Ser Thr Gln Thr Glu Arg Gly	
445 450 455 460	
acg gaa tcg aac aaa act gca gct gtt gct ccc atc tct gtt cct gct	2224
Thr Glu Ser Asn Lys Thr Ala Ala Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Ala	
465 470 475	
cca gtt gct gct gcc gcc act gct gcc gcc atc act gcc act gct gcc	2272
Pro Val Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ile Thr Ala Thr Ala Ala	
480 485 490	
acc atc acc acc acc atg gta gct gct gct cca gtt gct gtt gct gct	2320
Thr Ile Thr Thr Thr Met Val Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala	
495 500 505	
gct gct gct cca gct gct gct gct gcc ccg tct cca gcc act gcc gct	2368
Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Pro Ala Thr Ala Ala	
510 515 520	
gct act gct gct gct gtt tct cca gct gct gct ggt cag att cca gct	2416
Ala Thr Ala Ala Ala Val Ser Pro Ala Ala Ala Gly Gln Ile Pro Ala	
525 530 535 540	
gct gcc tct gtt gcc tca gct gct gcc gtt gct cct tct gct gct gct	2464
Ala Ala Ser Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala Ala	
545 550 555	
gct gct gct gtt cag gtt gct cca gct gct ccg gct cca gtt cca gct	2512
Ala Ala Ala Val Gln Val Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro Ala	
560 565 570	
ccg gct ctg gtt ccg gtt cca gct cca gca gcg gct cag gct tct gct	2560
Pro Ala Leu Val Pro Val Pro Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ser Ala	
575 580 585	
cct gct cag act cag gca cca act tca gct ccg gct gtg gct cca act	2608
Pro Ala Gln Thr Gln Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr	
590 595 600	

cca gct cca act cca act cca gct gtg gct cag gct gag gtt cct gca 2656
Pro Ala Pro Thr Pro Thr Pro Ala Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Ala
605 610 615 620

agt cca gct acc ggt cct gga cca cat cgt ttg tct ata cca agt ttg 2704
Ser Pro Ala Thr Gly Pro Gly Pro His Arg Leu Ser Ile Pro Ser Leu
625 630 635

acc tgc aat cca gac aaa aca gat ggg cct gtg ttc cac tcc aat act 2752
Thr Cys Asn Pro Asp Lys Thr Asp Gly Pro Val Phe His Ser Asn Thr
640 645 650

ctg gaa aga aaa act ccc att cag atc ctg gga caa gag cct gat gca 2800
Leu Glu Arg Lys Thr Pro Ile Gln Ile Leu Gly Gln Glu Pro Asp Ala
655 660 665

gag atg gtg gaa tat ctc atc taa acggccaaat caagagctgc agattatcag 2854
Glu Met Val Glu Tyr Leu Ile
670 675

caaaaatgct tttaatcatt ttcccccttt tatttggttct tgttttgagg gtgaggacaa 2914

gggttggtggg gaggggatgt tttttaacag gactttttat tggaacaatg tactacttga 2974

gtaataccat gtgaacacca gtctattttg gtatgcttag ggagtacctc taaagacaga 3034

ttaatcagaa tgtgctctaa agcttattgt ttgaatttat acgaatactg ggactgttaa 3094

caggtggcta tacatgacg ttttcaatgt gcttaaattt gtttaaattt tccatattct 3154

agatcatttt ttattgaaga gcacagtatg tgtggaagac agtgtataac acgtagtttg 3214

gaagtgggaa gctagagaga attgagtgtg tgctgttttg tatagttact atcctgtgca 3274

gcagctggag aaagcactca cctcaggctt acaaaagggg atagtttcag gagctatgta 3334

agctggaaaa aaggtagggg gttttggggg gcagaagggt actggagcta attttttctt 3394

ccagtttccc agctacctg ccccaggga ttgtgtttgt cttcatttca gtggtgcttt 3454

ggaaatggat tcttttggtt cctcctgga gggtcatata ttcatatata tgctctggag 3514

taatttatgc atttgataa ttaatatatt gctttcagat gctgggagag tacattaact 3574

gagtgatgog caacttctc tctcttaggg aattagacca tcagaggcct tgatggagag 3634

ttgcatgggg tgctatatgc agacttccat gggttggtgtg tagccatgaa cacagcttgc 3694

ttgcatttag taagaccaat cagcttagtg tttatttctt ctacagcaca gattcactgg 3754

ctgggtctcc agtctcaaat tgccaatcat ttgcaaagtg aggaaggatc tttgttgaca 3814

ggttgaatgc tttgaatttc tgggtgactac tttgaaataa cttgttttgt ttgtcaaatt 3874
 ctaagcatat gtcttaaaag gcatttttga ctatcacctc caaggggaata gcttgagaaa 3934
 cccaaagtac tatgctgcag tcgggggaga ggtggattgc agcagtatcc tcaactacct 3994
 cttctcactg tcagtgcacac catcttggaa tacctttggg aagcagcagg aaatgtgcat 4054
 gtgggtagag atcaaaggag gcaatggctc caagccttgc catagggctg cctccaagga 4114
 cacagaagga tgccagttgc cacaggctcc tgccctgtgt cacctgtctg ccttcatta 4174
 aggtgagaaa tctgcagata gcattcattaa gatcagtttt aaggggtata gggaggggtga 4234
 ggggaagtggg ggggtgttagg taagggttgg gggtagaggt ttgggatgt cttagttaga 4294
 aaccagatta atagaagagt aggcctgata tattacatca tgagccatag tgggtggaaa 4354
 gaactttagc aatatagccc tacctcctca ttttagtgat gaggaatctg agaactggag 4414
 aggttcagtg actttttgaa agtcatacaa cacagctaac cattatgccca atcaccatgc 4474
 ttattttggg aaactcttta tcttttttaa attccatttt atgaaaaggc atcttcattg 4534
 tccaggggaat atgtatcttg taaaatgtac ctgggtggag tagcttgccc agtcttgaca 4594
 aactactgaa tttctgtctt gcctctcctt cagtgccttt taaaagggtt tcccttttct 4654
 gatctgcatt tcaacataga gtcacataaa tgtccccctg agaaaccaat cccacttctt 4714
 tctaggagat tgggtatctt agataatctt ttgggggtcc tctgtgagta taggaatggg 4774
 atccttctta attatcttcc aaaggaatta ttttgtgtgt gtgcctgtgt gtgtgtagag 4834
 acataaagga ggggtgatgtg attttcagct agtcccttca cattttcaat aatgaggtaa 4894
 tcatgttaca tacacattag tcctcagtta taaagtgaat ctcatagata aattaaaagt 4954
 gcagttgtgt taagactctt tcatactacc ctttagtcat aaggagaaaa aaacactcaa 5014
 atagtagaag cagcaagtag caaacttcag gagagctact ttctatccaa ataatttaaa 5074
 aaacactttt cacctactcc tttcatgggt ataacacatt ggcagacttt ttgctggctc 5134
 tgggagccat gattttaatc acattctgca aggtgacaaa tgtcatacat tccacattgt 5194
 gtggtagcca tctctttaga ctcatgtgtt ttggggaaaag gaagaagttc ttggctgagt 5254
 actattttga actttccaga accctctcac accagagaca gttcttctct gttcagtttc 5314
 caatcccoga taatttgcta aaataacatt gtacatccaa gagaggggaag aagagtatgt 5374

cagtatatta tgcagaagat agatacagcc ttttcagaag atctccacta gtttttgttc 5434
 caaaaattca agtttatggg agaaatctca attagccacc ttttcacagt tgtgtggata 5494
 taacatttgg gggatcttcc tggactccta cctatctgtg cattttaccg gcacctcagg 5554
 aaaggagggt gaccagggtg tcttagcttg tactgcttgg tgatctctga ggaccttcta 5614
 attcagttgt accccagtgt tccatgtata gaaaaacttc attagaacaa actttacttg 5674
 atatgaaact cctattaaca gtcttttttt gaaataaaaa gtagcttgag ctttctttta 5734
 aaatcatgta tcttgattgt tgatttaatg aaggatttcc ttttaatgct gcttttgagc 5794
 ttcaaggtaa taggacagca ggaacctaaa atatctgcc aatctgcc taggaaagat 5854
 acccagagac ccatcatgtt ctctttttgt tgttacctg ttgggtgggt ataacaattg 5914
 gaaaatgaac aaactgattg attgtgcaaa ctacttttta tgacaagcct aaacctcat 5974
 aatgcggcag cttaaagtgt atacatatgc actaactttg atcaattata ttctcatatc 6034
 tgttagctac acagtctcct attatctcaa ttgcttatgt gcatatggaa tatgttactt 6094
 aaaacgtgtg cattcttact gaaaatgttt tcaaaggaag gtatcagctg tgggctaatt 6154
 gccaccaatt tcagcctgcc acgattcttg gaaatatgtc ttccaagtgc catccatcat 6214
 cagtaggaca agtgtcggga gtttgtttat tttttccag tagcaacgat gggttacatg 6274
 gagccatgaa acctccttct ggcctcctt gtgattaatg gcatgtgttt gtaaaatgga 6334
 tagctgggggt tggcagatgg ctagagaaga atcgctttg gtttaaaatg tatgtggtcc 6394
 cctaattgatt gtgaccccat tctgtaatca actgagctag ttccaataaa gttaagcagg 6454
 tttaaatcc 6463

<210> 2
 <211> 675
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Pro Arg Ala Gln Pro Ser Ser Ala Ser Tyr Gln Pro Val Pro Ala
 1 5 10 15
 Asp Pro Phe Ala Ile Val Ser Arg Ala Gln Gln Met Val Glu Ile Leu
 20 25 30

Ser Asp Glu Asn Arg Asn Leu Arg Gln Glu Leu Glu Gly Cys Tyr Glu
35 40 45

Lys Val Ala Arg Leu Gln Lys Val Glu Thr Glu Ile Gln Arg Val Ser
50 55 60

Glu Ala Tyr Glu Asn Leu Val Lys Ser Ser Ser Lys Arg Glu Ala Leu
65 70 75 80

Glu Lys Ala Met Arg Asn Lys Leu Glu Gly Glu Ile Arg Arg Met His
85 90 95

Asp Phe Asn Arg Asp Leu Arg Glu Arg Leu Glu Thr Ala Asn Lys Gln
100 105 110

Leu Ala Glu Lys Glu Tyr Glu Gly Ser Glu Asp Thr Arg Lys Thr Ile
115 120 125

Ser Gln Leu Phe Ala Lys Asn Lys Glu Ser Gln Arg Glu Lys Glu Lys
130 135 140

Leu Glu Ala Glu Leu Ala Thr Ala Arg Ser Thr Asn Glu Asp Gln Arg
145 150 155 160

Arg His Ile Glu Ile Arg Asp Gln Ala Leu Ser Asn Ala Gln Ala Lys
165 170 175

Val Val Lys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Lys Lys Gln Val Tyr Val Asp
180 185 190

Lys Val Glu Lys Met Gln Gln Ala Leu Val Gln Leu Gln Ala Ala Cys
195 200 205

Glu Lys Arg Glu Gln Leu Glu His Arg Leu Arg Thr Arg Leu Glu Arg
210 215 220

Glu Leu Glu Ser Leu Arg Ile Gln Gln Arg Gln Gly Asn Cys Gln Pro
225 230 235 240

Thr Asn Val Ser Glu Tyr Asn Ala Ala Ala Leu Met Glu Leu Leu Arg
245 250 255

Glu Lys Glu Glu Arg Ile Leu Ala Leu Glu Ala Asp Met Thr Lys Trp
260 265 270

Glu Gln Lys Tyr Leu Glu Glu Asn Val Met Arg His Phe Ala Leu Asp
275 280 285

Ala Ala Ala Thr Val Ala Ala Gln Arg Asp Thr Thr Val Ile Ser His
290 295 300

Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asp	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln	Lys	305	310	315	320
Glu	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Met	Ala	Asn	Lys	Arg	Cys	Leu	Asp	Met	Glu	325	330	335	
Gly	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	His	Ala	Gln	Ile	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Met	340	345	350	
Ile	Lys	Val	Leu	Gln	Gln	Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Thr	Glu	355	360	365	
Gln	Leu	Ser	Cys	Met	Arg	Pro	Ala	Lys	Ser	Leu	Met	Ser	Ile	Ser	Asn	370	375	380	
Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Leu	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Gly	Ser	Pro	385	390	395	400
Ile	Met	Glu	Glu	Lys	Arg	Asp	Asp	Lys	Ser	Trp	Lys	Gly	Ser	Leu	Gly	405	410	415	
Ile	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Tyr	Arg	Ala	Glu	Tyr	Val	Pro	Ser	Thr	Pro	420	425	430	
Ser	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ala	His	Ser	Lys	Thr	435	440	445	
Gly	Ser	Arg	Asp	Cys	Ser	Thr	Gln	Thr	Glu	Arg	Gly	Thr	Glu	Ser	Asn	450	455	460	
Lys	Thr	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Ala	465	470	475	480
Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Ile	Thr	Thr	485	490	495	
Thr	Met	Val	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	500	505	510	
Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	515	520	525	
Ala	Val	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Gln	Ile	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Val	530	535	540	
Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	545	550	555	560
Gln	Val	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Leu	Val	565	570	575	

Pro Val Pro Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ser Ala Pro Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Pro Ala Pro Thr
595 600 605

Pro Thr Pro Ala Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Ala Ser Pro Ala Thr
610 615 620

Gly Pro Gly Pro His Arg Leu Ser Ile Pro Ser Leu Thr Cys Asn Pro
625 630 635 640

Asp Lys Thr Asp Gly Pro Val Phe His Ser Asn Thr Leu Glu Arg Lys
645 650 655

Thr Pro Ile Gln Ile Leu Gly Gln Glu Pro Asp Ala Glu Met Val Glu
660 665 670

Tyr Leu Ile
675

<210> 3
<211> 675
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> () ..
<223> Residue 135 = Asn, Ser or Asp

<220>
<221> VARIANT
<222> () .. (150)
<223> Residues 148-150 = Glu-Leu-Ala or Thr-Thr-Pro

<400> 3
Met Pro Arg Ala Gln Pro Ser Ser Ala Ser Tyr Gln Pro Val Pro Ala
1 5 10 15

Asp Pro Phe Ala Ile Val Ser Arg Ala Gln Gln Met Val Glu Ile Leu
20 25 30

Ser Asp Glu Asn Arg Asn Leu Arg Gln Glu Leu Glu Gly Cys Tyr Glu
35 40 45

Lys Val Ala Arg Leu Gln Lys Val Glu Thr Glu Ile Gln Arg Val Ser
50 55 60

Glu Ala Tyr Glu Asn Leu Val Lys Ser Ser Ser Lys Arg Glu Ala Leu
65 70 75 80

Glu	Lys	Ala	Met	Arg	Asn	Lys	Leu	Glu	Gly	Glu	Ile	Arg	Arg	Met	His
				85					90					95	
Asp	Phe	Asn	Arg	Asp	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Asn	Lys	Gln
			100				105						110		
Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Tyr	Glu	Gly	Ser	Glu	Asp	Thr	Arg	Lys	Thr	Ile
		115					120					125			
Ser	Gln	Leu	Phe	Ala	Lys	Xaa	Lys	Glu	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Lys
	130					135					140				
Leu	Glu	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Ala	Arg	Ser	Thr	Asn	Glu	Asp	Gln	Arg
145					150					155					160
Arg	His	Ile	Glu	Ile	Arg	Asp	Gln	Ala	Leu	Ser	Asn	Ala	Gln	Ala	Lys
			165						170					175	
Val	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys	Lys	Gln	Val	Tyr	Val	Asp
			180					185					190		
Lys	Val	Glu	Lys	Met	Gln	Gln	Ala	Leu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Cys
		195					200					205			
Glu	Lys	Arg	Glu	Gln	Leu	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Thr	Arg	Leu	Glu	Arg
	210					215					220				
Glu	Leu	Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Gln	Gln	Arg	Gln	Gly	Asn	Cys	Gln	Pro
225					230				235						240
Thr	Asn	Val	Ser	Glu	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ala	Leu	Met	Glu	Leu	Leu	Arg
				245					250					255	
Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Glu	Ala	Asp	Met	Thr	Lys	Trp
			260					265					270		
Glu	Gln	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Met	Arg	His	Phe	Ala	Leu	Asp
		275					280					285			
Ala	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ala	Gln	Arg	Asp	Thr	Thr	Val	Ile	Ser	His
		290					295				300				
Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asp	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln	Lys
305					310					315					320
Glu	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Met	Ala	Asn	Lys	Arg	Cys	Leu	Asp	Met	Glu
				325					330					335	
Gly	Arg	Ile	Lys	Thr	Leu	His	Ala	Gln	Ile	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Met
			340					345					350		

Ile Lys Val Leu Gln Gln Arg Ser Arg Lys Glu Pro Ser Lys Thr Glu
355 360 365

Gln Leu Ser Cys Met Arg Pro Ala Lys Ser Leu Met Ser Ile Ser Asn
370 375 380

Ala Gly Ser Gly Leu Leu Ser His Ser Ser Thr Leu Thr Gly Ser Pro
385 390 395 400

Ile Met Glu Glu Lys Arg Asp Asp Lys Ser Trp Lys Gly Ser Leu Gly
405 410 415

Ile Leu Leu Gly Gly Asp Tyr Arg Ala Glu Tyr Val Pro Ser Thr Pro
420 425 430

Ser Pro Val Pro Pro Ser Thr Pro Leu Leu Ser Ala His Ser Lys Thr
435 440 445

Gly Ser Arg Asp Cys Ser Thr Gln Thr Glu Arg Gly Thr Glu Ser Asn
450 455 460

Lys Thr Ala Ala Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Ala Pro Val Ala Ala
465 470 475 480

Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ile Thr Ala Thr Ala Ala Thr Ile Thr Thr
485 490 495

Thr Met Val Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Ala Pro
500 505 510

Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ala Thr Ala Ala
515 520 525

Ala Val Ser Pro Ala Ala Ala Gly Gln Ile Pro Ala Ala Ala Ser Val
530 535 540

Ala Ser Ala Ala Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Val
545 550 555 560

Gln Val Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Leu Val
565 570 575

Pro Val Pro Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ser Ala Pro Ala Gln Thr
580 585 590

Gln Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Pro Ala Pro Thr
595 600 605

Pro Thr Pro Ala Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Ala Ser Pro Ala Thr
610 615 620

Gly Pro Gly Pro His Arg Leu Ser Ile Pro Ser Leu Thr Cys Asn Pro
625 630 635 640

Asp Lys Thr Asp Gly Pro Val Phe His Ser Asn Thr Leu Glu Arg Lys
645 650 655

Thr Pro Ile Gln Ile Leu Gly Gln Glu Pro Asp Ala Glu Met Val Glu
660 665 670

Tyr Leu Ile
675

<210> 4

<211> 143

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Ser Asn Lys Thr Ala Ala Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Ala Pro
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ile Thr Ala Thr Ala Ala Thr
20 25 30

Ile Thr Thr Thr Met Val Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala
35 40 45

Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Pro Ala Thr Ala Ala Ala
50 55 60

Thr Ala Ala Ala Val Ser Pro Ala Ala Ala Gly Gln Ile Pro Ala Ala
65 70 75 80

Ala Ser Val Ala Ser Ala Ala Ala Val Ala Pro Ser Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Val Gln Val Ala Pro Ala Ala Pro Ala Pro Val Pro Ala Pro
100 105 110

Ala Leu Val Pro Val Pro Ala Pro Ala Ala Ala Gln Ala Ser Ala Pro
115 120 125

Ala Gln Thr Gln Ala Pro Thr Ser Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr
130 135 140

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for PCR reaction

<400> 5

tacggatccg aatcgaacaa aactgcagct g

31

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for PCR reaction

<400> 6

atactcgagt catggagctg gagttggagc ca

32

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for PCR reaction

<400> 7

gtttgacctg caatccagac aa

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for PCR reaction

<400> 8

cccaggatct gaatgggagt t

21

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for PCR reaction

<400> 9

cagatgggcc tgtgttccac tccaa

25

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 10

gctgacagtt gccctgaogc tgct

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 11

cggagacggt gctctagctg ctca

24

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 12

tccttccaac tcttgctca agttcog

27

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 13

ggtggcagcg gacaggcagg atac

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 14

gaggcggaga gaactaagag aaga

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
primer for RACE PCR reaction

<400> 15

gagcggagat ggaggagtaa ttca

24

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Izolált humán angiosztatin-kötő protein-1 (ABP-1), amely képes megkötni a plazminogén 1-4 Kringle doménjét, és amely egy, a 2., 3. vagy 4. számú szekvenciához (SEQ ID NO. 2, 3, 4) képest körülbelül 80 %-nál nagyobb szekvenciahomológiával rendelkező aminosav-szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti protein, amelyben az aminosav-szekvencia körülbelül 90 %-os szekvenciahomológiájú a 2., 3. vagy 4. számú szekvenciával.

3. Az 1. igénypont szerinti protein, amelyben az aminosav-szekvencia körülbelül 95 %-os szekvenciahomológiájú a 2., 3. vagy 4. számú szekvenciával.

4. Az 1. igénypont szerinti protein, amelyben az aminosav-szekvencia körülbelül 98 %-os szekvenciahomológiájú a 2., 3. vagy 4. számú szekvenciával.

5. A 4. igénypont szerinti protein, amely a 2. számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmaz.

6. A 4. igénypont szerinti protein, amely a 3. számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmaz, ahol a 135-ös helyzetben lévő aminosavcsoport Asn, Ser vagy Asp, és a 148-150 helyzetben lévő három aminosavcsoport a Glu-Leu-Ala tripeptid vagy a Thr-Trp-Pro tripeptid.

7. A 4. igénypont szerinti protein, amely a 4. számú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvenciát tartalmaz.

8. Izolált nukleinsav-molekula, amely egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti proteint vagy peptidet kódoló szekvenciát

tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely az 5. igénypont szerinti proteint kódolja.

10. A 8. igénypont szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely a 6. igénypont szerinti proteint kódolja.

11. A 8. igénypont szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely a 7. igénypont szerinti proteint kódolja.

12. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely legalább az 1. számú szekvencia (SEQ ID NO. 1) 2177. nukleotidjától a 2608. nukleotidig terjedő szekvenciát tartalmazza.

13. A 8. igénypont szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely az 1. számú szekvencia 797. nukleotidjától a 2824. nukleotidig terjedő szekvenciát tartalmazza.

14. A 13. igénypont szerinti izolált nukleinsav-molekula, amely az 1. számú szekvenciát tartalmazza.

15. Vektor, amely egy 8-14. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavat tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti vektor, amely egy plazmid.

17. A 15. igénypont szerinti vektor, amely egy vírus.

18. A 15. igénypont szerinti vektorral transzformált vagy transzfektált rekombináns sejt.

19. Antitest vagy antitestfragmentum, amely specifikusan kötődik egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti proteinnel vagy peptiddel.

20. Egy 19. igénypont szerinti antitest, amely egy monoklonális antitest vagy ennek egy fragmentuma.

21. A 19. vagy 20. igénypont szerinti antitest gyógyszerként történő felhasználásra.

22. Rekombináns sejt, amely a 19. vagy 20. igénypont szerinti antitestet expresszálja.

23. Szkrínelési eljárás olyan vegyületek azonosítására, amely vegyületek képesek kölcsönhatásba lépni egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti proteinnel.

24. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti proteinek vagy vegyületek gyógyszerként történő felhasználásra.

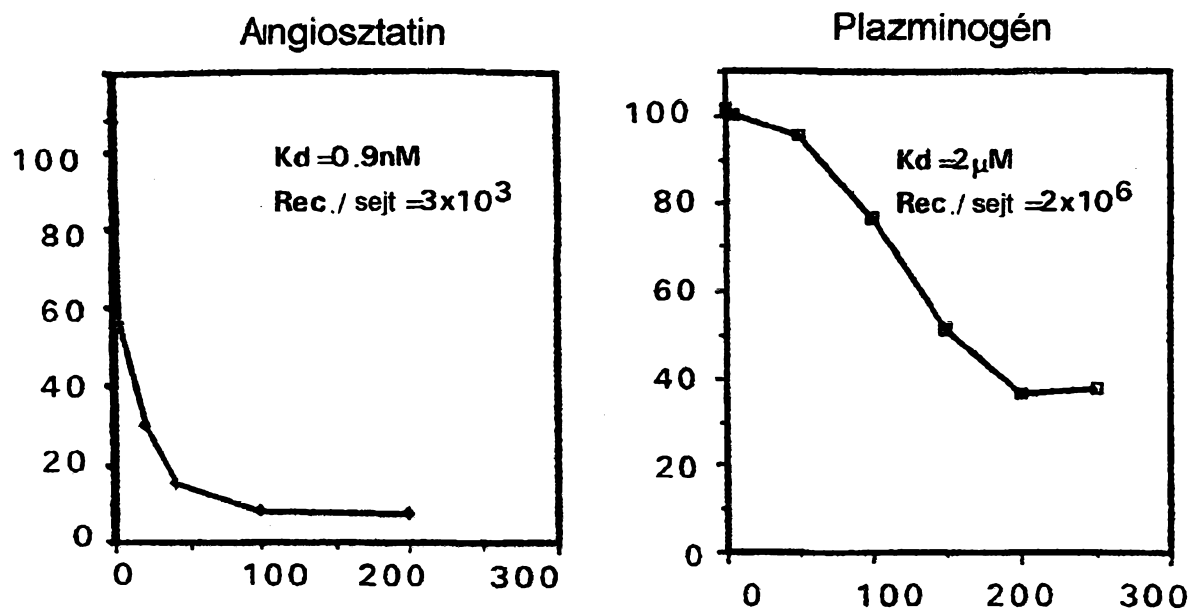
25. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vegyületek és a 23. igénypontban meghatározott vegyületek alkalmazása angiogenezissel kapcsolatos betegségekre vagy rendellenességekre irányuló gyógyszerek előállítására.

26. Gyógyszerkészítmény, amely egy gyógyászatilag elfogadható hordozóval együtt egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet vagy egy, a 23. igénypontban meghatározott vegyületet tartalmaz.

A meghatalmazott:

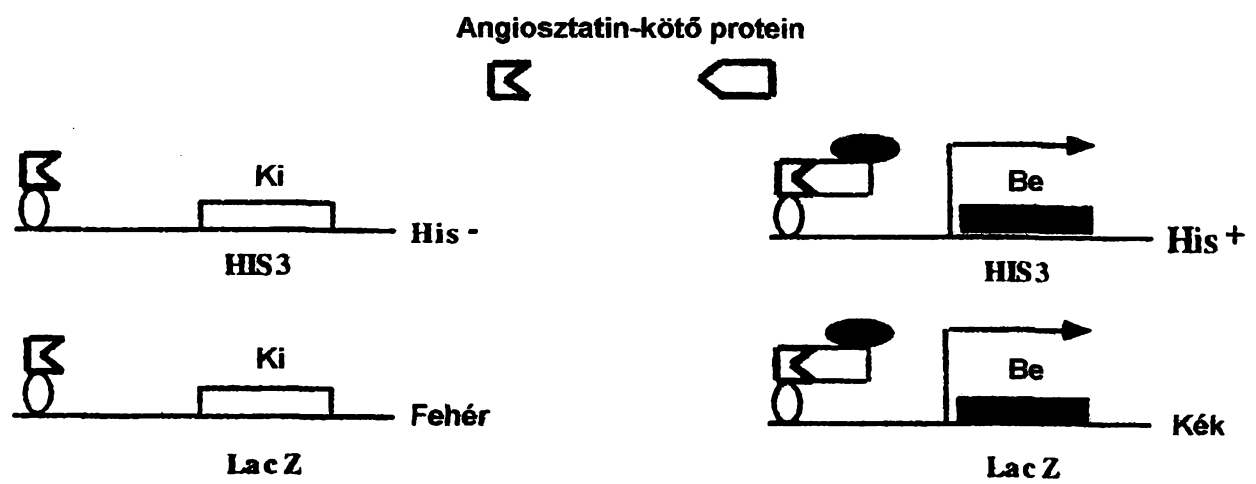
Dérysi Katalin
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & Co. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-32

55 oldal
12 dőlt oldal
60 oldal
Bécs



1. ábra

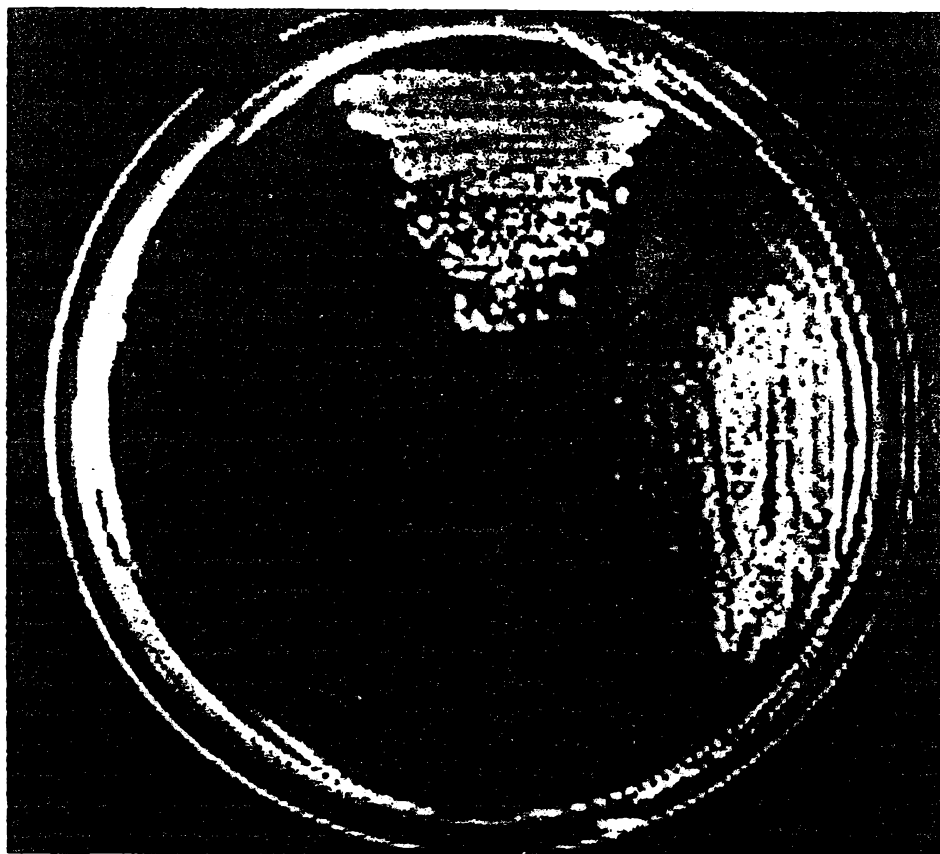
2/12



2. ábra

3/12

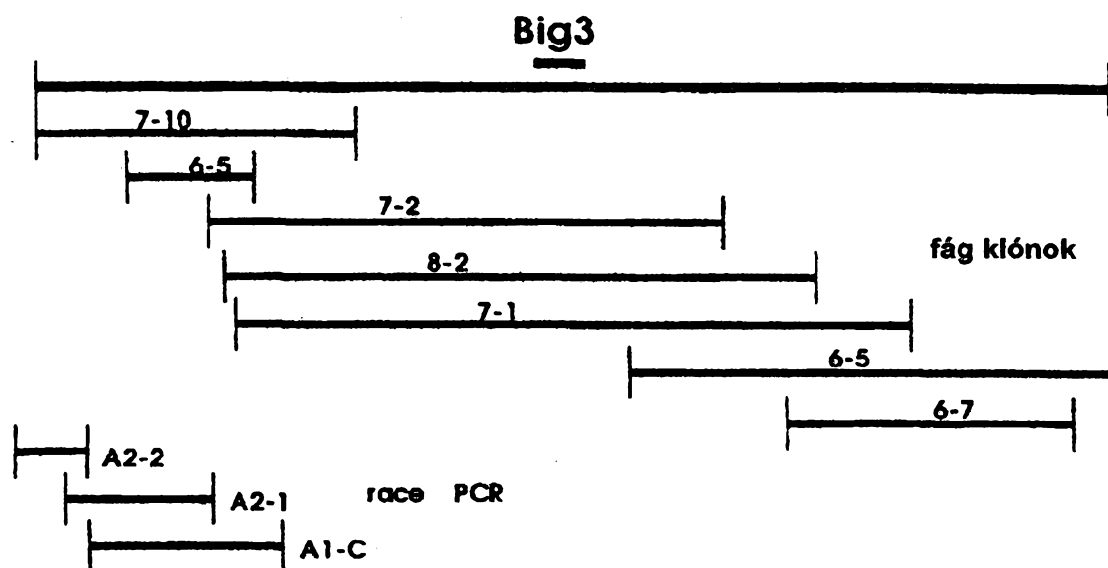
-His, +3-AT



3. ábra

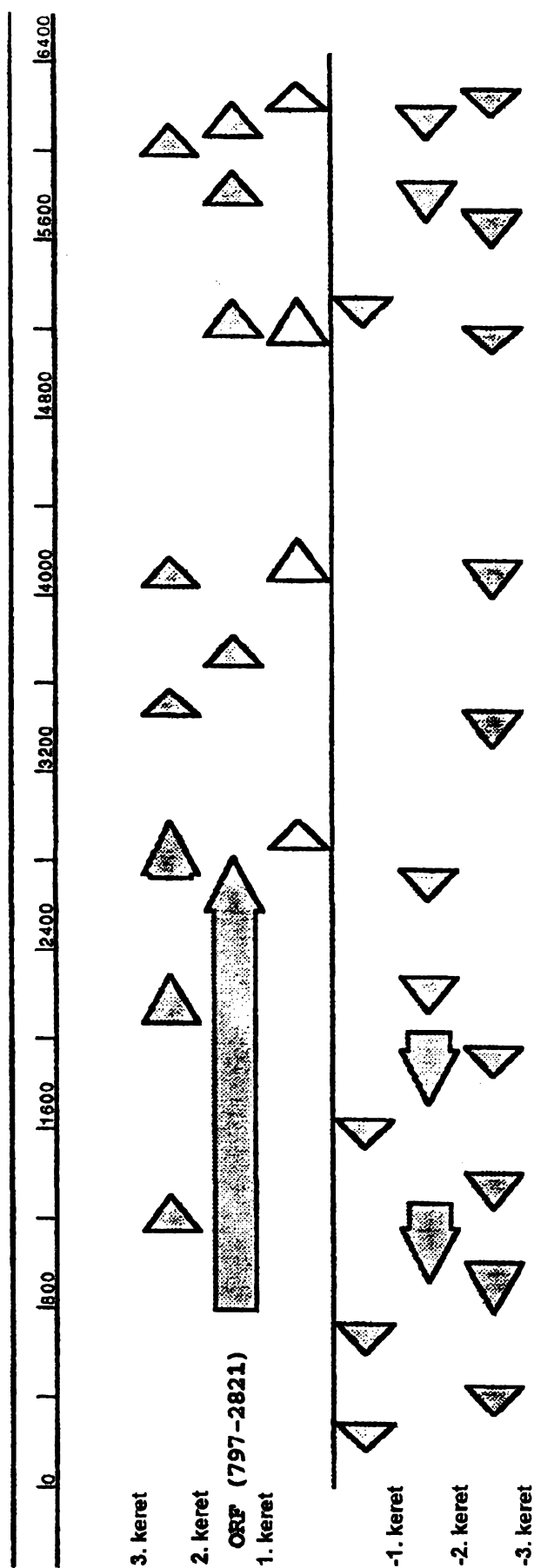
4/12**Angiosztatin****Plazminogén****Big-3 R0****Big-3 R0****4. ábra**

5/12



5. ábra

6/12

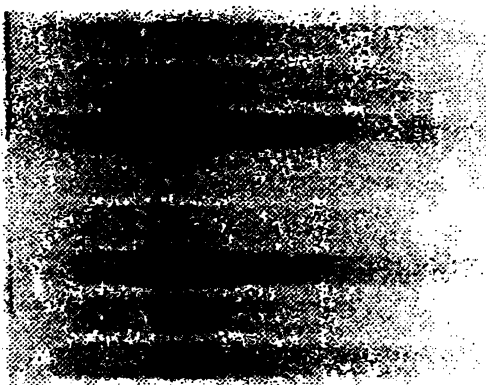


6. ábra

7/12

Felnőtt

Hrt Br Pi Lu Li Sz Ki Ps

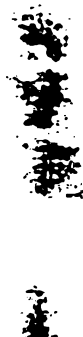


Magzati

Br Lu Li Ki

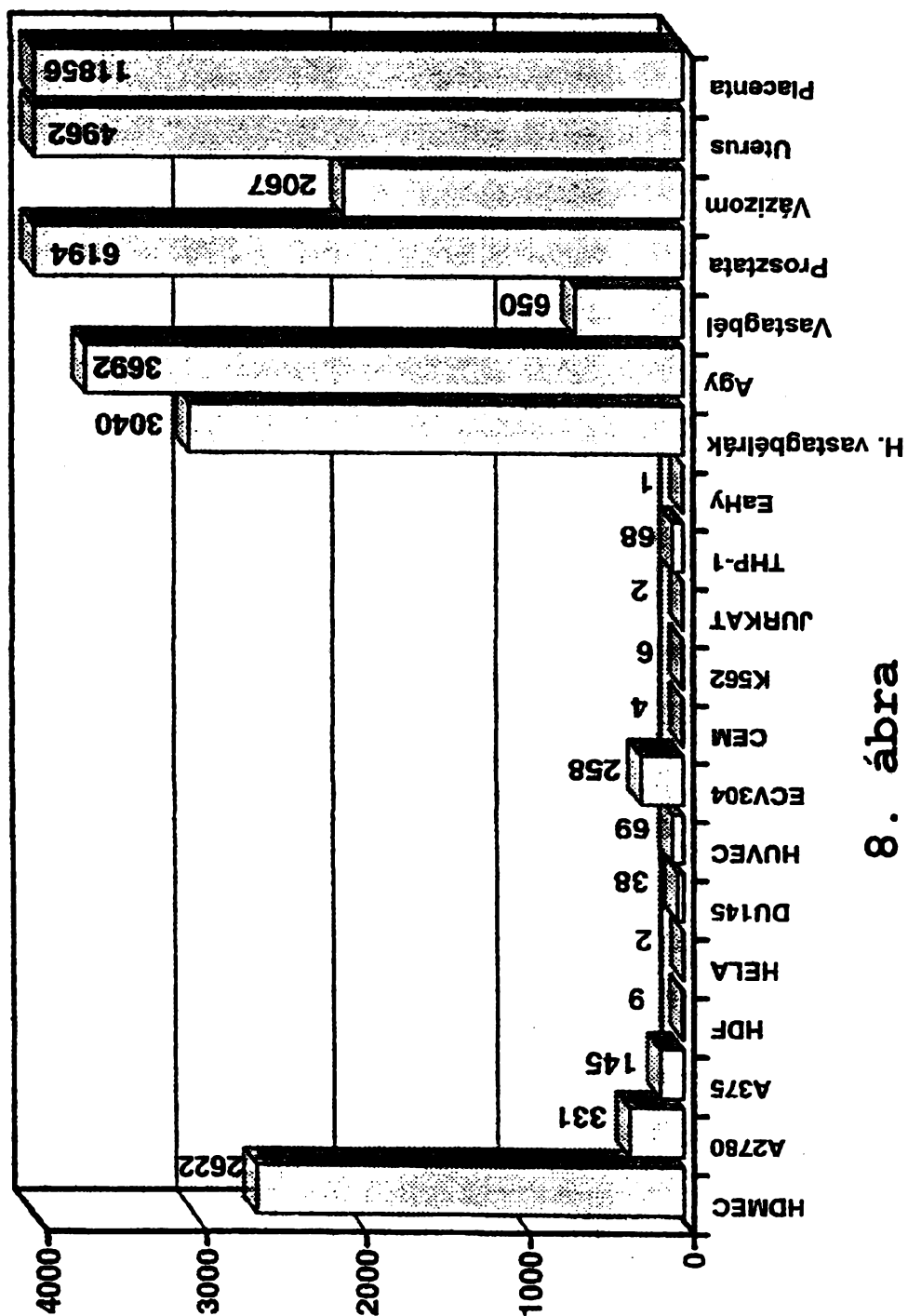


HF Huv EA Ec BAE BME



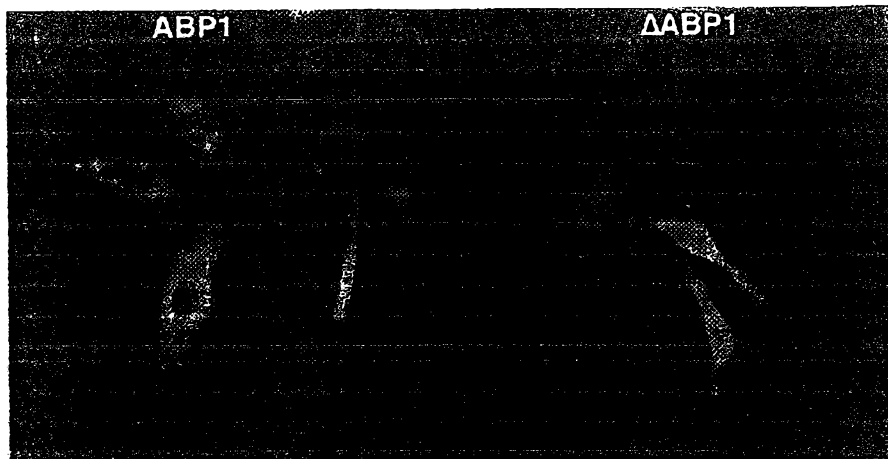
7. ábra

8/12

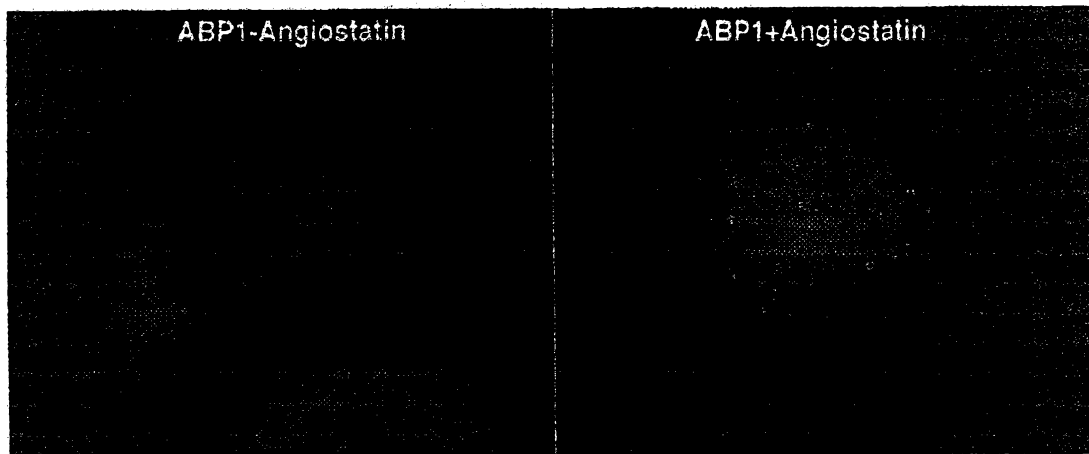


8. ábra

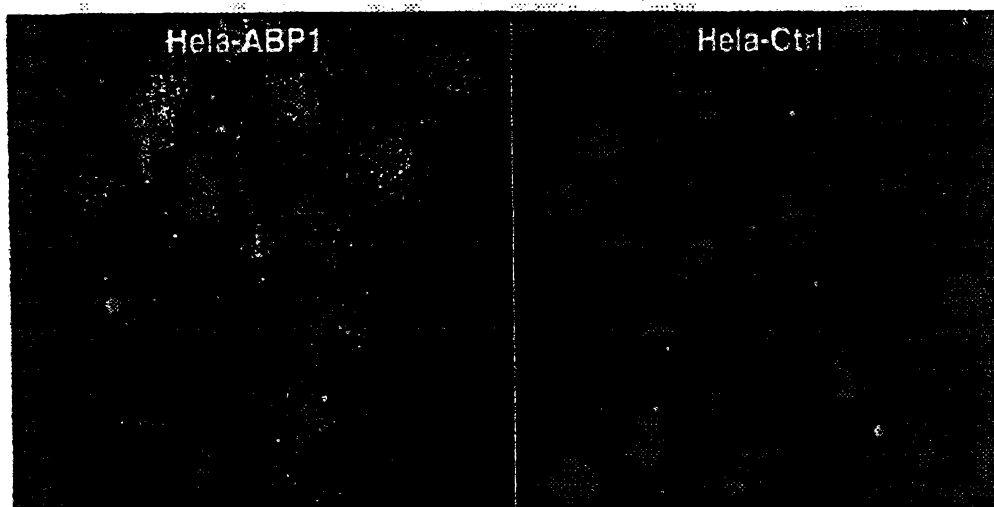
9/12



9A. ábra

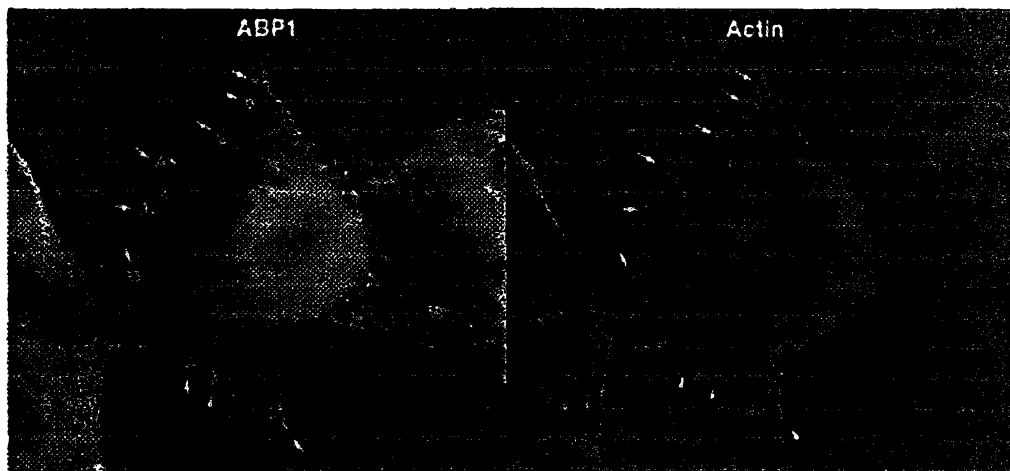


9B. ábra



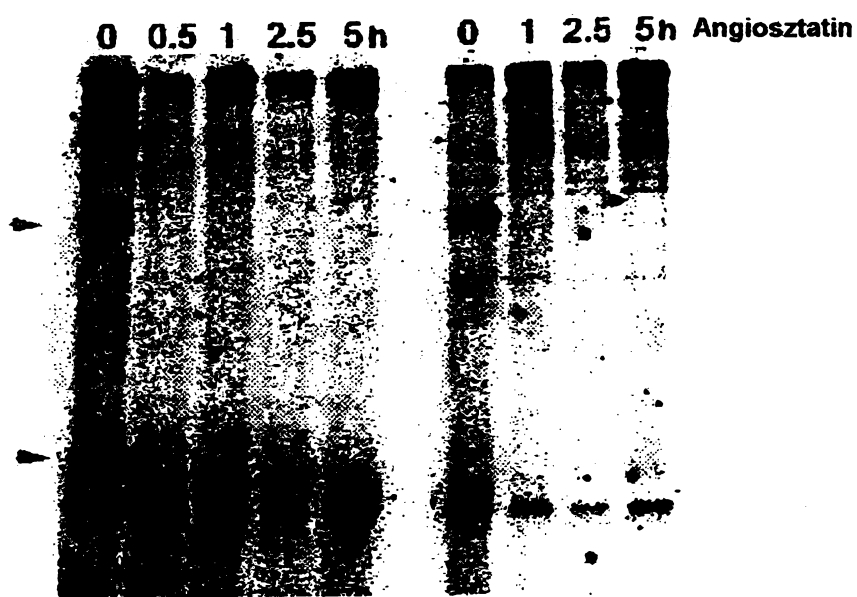
9C. ábra

10/12



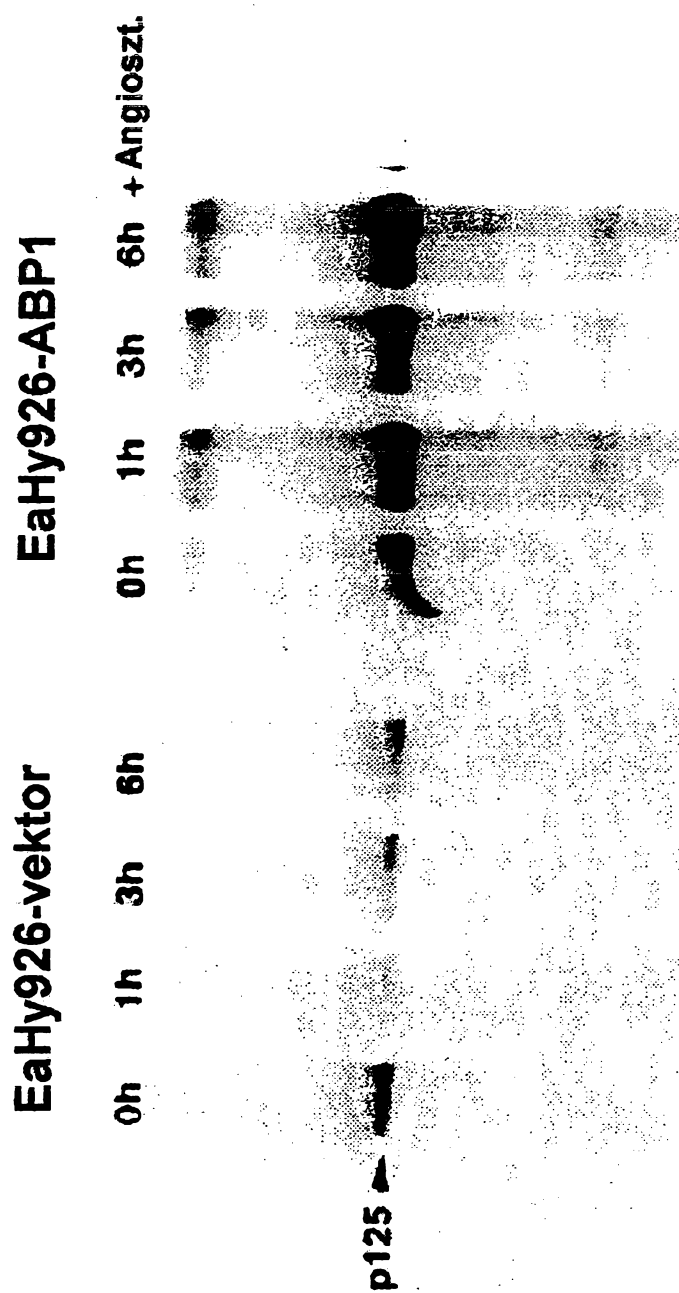
9D. ábra

11/12



10. ábra

12/12



11. ábra