

**Eljárás kémiai hatóanyagok azonosítására és hatóanyagok az 1-dezoxi-D-xilulóz-
-5-foszfát bioszintézisút gátlására**

K I V O N A T

A találmány eljárás egy- vagy többsejtű paraziták okozta megbetegedések kezelésére alkalmas kémiai hatóanyagok megtalálására. Az eljárás során az 1-dezoxi-D-xilulóz--5-foszfát anyagcsereúton részt vevő proteineket vagy azonos hatású származékaikat a paraziták elleni hatására vizsgálni kívánt anyagokkal érintkeztetik, majd a proteineket vagy származékaikat gátló anyagokat kiválasztják. A találmány továbbá az azonosított hatóanyagokra és paraziták okozta fertőző betegségek kezelésére alkalmazható gyógyászati készítmények előállításához való alkalmazásukra is vonatkozik.



Már a múltban számos úton próbáltak kemoterápiás anyagokat fejleszteni paraziták ellen, különösen a malária és a bilharciózis kórokozója ellen. A egyik út az un. izoprénoid-bioszintézis gátlása volt. Az izoprénoidok izoprén-egységekből (izopentenil-difoszfát) felépülő molekulák, amelyeknek a sejtben fontos szerepe van. Ide tartoznak szterolok, ubikinonok és egyéb, a paraziták háztartásában fontos molekulák. A választott mód gombákba és emlőssejtekbe juttatott modellen alapult. Gombákban és emlőssejtekben az izopentenil-difoszfát a legelső három acetil-CoA molekula HMG-CoA-t eredményező kondenzálása útján jön létre. A HMG-CoA-t a HMG-CoA-reduktáz mevalonáttá alakítja, amely mevalonát-foszfáton mint közbenső termékén keresztül izopentenil-difoszfáttá alakul (lásd 7. ábra). A HMG-CoA-reduktáz enzimet gátló anyagokat, például lovastatint, simvastatint és pravastatint a paraziták növekedésének gátlására alkalmazták. A malária esetén sikerült ugyan lovastatin és simvastatin igen nagy dóziséval *in vitro* gátlást elérni, de *in vivo* az inhibíció nem sikerült. Sisztoszómával fertőzött egerek lovastatinnal végzett kezelése a férgek petekelését gátolta, de igen nagy lovastatin-koncentrációt kellett alkalmazni ahhoz, hogy a férgek egy része *in vivo* elpusztult.

Meglepő módon azt találtuk, hogy a parazitáknak, különösen plazmódiumoknak és tripanoszómáknak (a malária és az álomkór kórokozói) legalább egy további anyagcsereútja van izoprénoidok szintézisére. Ez az anyagcsereút glicerinaldehid-3-foszfát és piruvat 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfátot (DOXP) eredményező kondenzálásán alapul. A DOXP 2-C-metil-D-eritroz-4-foszfáttá alakul, és az utóbbiból 2-C-metil-eritritol-4-foszfáton mint közbenső anyagon keresztül izopentenil-difoszfát keletkezik. Ebben az anyagcsereláncon egyebek között a DOXP-szintáz enzimnek és a DOXP-redukto-izomeráz enzimnek van szerepe (lásd 7. ábra). Az említett anyagcsereutat mindeztideig csak növényeknek, algáknak és néhány baktérium-

nak tulajdonították (Sprenger és mtsai, PNAS, 94 (1997), 12857-62, és Kuzuyama és mtsai, Tetrahedron Letters 39 (1998), 4509-12).

A fent leírt DOXP-anyagcsereút, különösen a DOXP-szintáz és DOXP-redukto-izomeráz enzimek szakember számára ismert technikával végzett gátlása alkalmas egy- vagy többsejtű paraziták emberben, állatban okozta fertőzések megelőzésére és kezelésére. Tekintettel arra, hogy ez az anyagcsereút emberben nem létezik, a módszer kiválóan alkalmas paraziták kemoterápiás leküzdésére. A kemoterápia céljaként különösen alkalmas a dezoxi-xilulóz-5-foszfát-szintáz és dezoxi-xilulóz-5-foszfáz-redukto-izomeráz enzim. Különösen mellékhatásmentesnek és alkalmasnak a malária dezoxi-xilulóz-5-foszfáz-redukto-izomeráz enzimjének a gátlása bizonyult, mert az ember sem a szubsztrátumokkal vagy azok előtermékeivel, sem az enzim termékével vagy magával az enzimmal nem rendelkezik.

A találmány tárgya eljárás olyan hatóanyagok megtalálására, amelyek a DOXP-anyagcsereutat gátolják. A találmány a hatóanyagok egy- vagy többsejtű paraziták okozta fertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállításához való alkalmazására is vonatkozik.

A találmány feladata új eljárás kidolgozása volt, amellyel paraziták okozta betegségek terápiájára alkalmas hatóanyagok azonosíthatók. A találmány további feladata olyan gyógyszerkészítmény kifejlesztése volt, amely a kórokozót szelektíve elpusztítja, emellett kevés mellékhatása van.

Ezt a feladatot az 1. igénypont szerinti eljárással oldottuk meg. A találmány szerinti eljárásra és a talált hatóanyagokra jellemző, hogy

- az izoprénoid-bioszintézis az un. 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-anyagcsereútban lesz gátolva.



Az itt leírt anyagcsereutak emberben és állatban nem fordulnak elő, csak növényekben, algákban, néhány eubaktériumban és parazitákban, így például malária-parazitákban; ezért a fenti terápiás stratégia nagyon kevés mellékhatással jár.

A jelen találmány továbbá az említett anyagcsereútban részt vevő enzimekre és ezen enzimek töredékeire is vonatkozik. Ezek az enzimek a találmány szerinti eljárásban hatóanyagok azonosítására alkalmas proteinek. A találmány továbbá ezeket az enzimeket, illetve töredékeiket kódoló DNS-szekvenciákra is vonatkozik.

A találmány az enzimek és töredékek azonosítására alkalmas eljárásra és antitestekre, valamint az enzimek vagy töredékek rekombináns technológiával történő előállítására is vonatkozik.

A találmány az enzimek vagy töredékek, vagy ezeket az enzimeket vagy töredékeiket kódoló DNS-szekvenciák egy- vagy többsejtű kórokozó ellen hatásos anyagok azonosítására történő alkalmazására is vonatkozik.

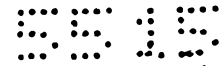
A találmány továbbá a találmány szerinti enzimek segítségével talált hatóanyagokra is vonatkozik.

Az alábbiakban a találmányt a csatolt rajzok alapján közelebbről ismertetjük.

Az 1a. ábra annak a génnek a nukleotid-szekvenciáját mutatja, amely a *Plasmodium falciparum* 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-redukto-izomeráz enzimjét kódolja,

az 1b. ábra annak a génnek a nukleotid-szekvenciáját mutatja, amely a *Plasmodium falciparum* 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz enzimjét kódolja,

a 2a. ábra annak a génnek a nukleotid-szekvenciáját mutatja, amely a *Plasmodium falciparum* 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-redukto-izomeráz enzimjét kódolja, amegfelelő aminosav-szekvenciával együtt,



a 2b. ábra annak a génnek a nukleotid-szekvenciáját mutatja, amely a *Plasmodium falciparum* 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz enzimjét kódolja, a megfelelő aminosav-szekvenciával együtt,

a 3a. ábra a *Plasmodium falciparum* 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-reduktoizomeráz enzimjének aminosav-szekvenciáját mutatja,

a 3b. ábra a *Plasmodium falciparum* parazita 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz enzimjének aminosav-szekvenciáját ábrázolja,

a 4a. ábra az 1b. ábrán mutatott nukleotid-szekvencia egy szakaszát mutatja,

a 4b. ábra a 2b. ábra szerinti nukleotid-szekvencia egy szakaszát mutatja a megfelelő aminosav-szekvenciával együtt,

a 4c. ábra a 3b. ábra szerinti aminosav-szekvencia egy szakaszát ábrázolja,

az 5. ábra az alábbi anyagok 3-3 dóziséval végzett négynapos kezelés után *in vivo* mért parazitémia-értékeket mutat :

Formyl = 3-(N-formil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó,

Acetyl = 3-(N-acetil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó,

a 6a. ábra *P. falciparum* növekedésének gátlását mutatja 3-(N-formil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (üres körök), illetve 3-(N-acetil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (fekete körök) adagolása után, HB3 törzs esetén,

a 6b. ábra *P. falciparum* növekedésének gátlását mutatja 3-(N-formil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (üres körök), illetve 3-(N-acetil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (fekete körök) adagolása után, az A2 törzs esetén, és

a 6c. ábra *P. falciparum* növekedésének gátlását mutatja 3-(N-formil-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (üres körök), illetve 3-(N-acetil-



-N-hidroxilamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó (fekete körök) ádagölása után, a Dd2 törzs esetén,

a 7. ábra a klasszikus acetát/mevalonát-bioszintézisutat és összehasonlításra az alternatív DOXP-bioszintézisutat mutatja.

A DOXP-szintáz és a DOXP-redukto-izomeráz enzimeket kódoló géneket genetikai eljárással mutattuk ki (1a., 1b., 2a., 2b. ábra). A *P. falciparum* genomjából polimeráz-lánreakcióval feldúsult géneket baktériumos plazmidokban klónoztuk, majd nukleotid-szekvenciájukat meghatároztuk. A szekvenciák adatai igen nagy homológiát mutatnak az algák, növények és baktériumok megfelelő génjeivel. Ez a nagy homológia azt mutatja, hogy a három gén *P. falciparum* DOXP-szintáz enzimjét és DOXP-redukto-izomeráz enzimjét kódolja.

Heterológ rendszerekben végzett expresszió után a rekombináns proteinként kapott enzimeket tisztítottuk és az aktivitás tanulmányozása céljából sejtmentes rendszerekben alkalmaztuk. A DOXP-szintáz aktivitását glicerin-aldehid-3-foszfát és piruvat 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfátot eredményező reakcióján mértük. A DOXP-redukto-izomeráz aktivitását 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát NADPH jelenlétében történő 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá alakulásán mértük, amikor is az NADPH-koncentráció változását paraméter-variálással mértük; ez az eljárás szakember számára ismert.

Az enzimek az azokat kódoló DNS-szekvenciákon (1a., 1b., 2a., 2b. ábra) és az ezekből adódó aminosav-szekvenciákon (3a. és 3b. ábra) keresztül definiálhatók. Az egyes paraziták enzimjei azonban különbözőek lehetnek. Általában aminosavcseréről van szó, de lehet kihagyás, inzert vagy hozzáadás is. A találmány szerinti enzimek - az exprimáló sejttől és sejtípustól függő terjedelemben és módon - glikozilezettek vagy nem glikozilezettek lehetnek.



A találmány szerinti enzimek vagy azok töredékeik a találmány szerinti DNS alkalmas expressziós rendszerekben, például baktériumokban, különösen *E. coli* baktériumban mint prokariota expressziós rendszerben, vagy eukariota expressziós rendszerben, különösen COS-sejtekben vagy *Dictyostelium discoideum*-ban végzett expressziójával állíthatók elő.

A találmány szerinti nukleinsav-szekvencia segítségével tetszőleges parazita genomjában a kódoló géneket vagy variánsaikat kereshetjük, azonosíthatjuk, majd az enzimeket kódoló kívánt géneket izolálhatjuk. Az ilyen eljárások szakember számára ismertek.

A rekombináns technológia alkalmazása lehetővé teszi az enzimek vagy töredékeik nagy számú változatának az előállítását. Ezek a származékok például egy vagy több aminosav vonatkozásában szubsztituálással, kivágással vagy addicionálással módosítottak lehetnek. A módosítás például helyre fajlagos mutagenézis (site directed mutagenesis) segítségével történhet. Az ilyen variálást szakember minden további nélkül elvégezheti; csak azt kell biztosítani, hogy az enzimek jellemző tulajdonságai megmaradjanak. Ezért a találmány további tárgya a DOXP-anyagcsereúton részt vevő enzimek, különösen DOXP-szintáz és DOXP-redukto-izomeráz, amelyre jellemző, hogy

- a) exogén DNS prokariota vagy eukariota expressziójának terméke,
- b) az 1a., 1b., 2a. vagy 2b. szerinti szekvencia kódolja, vagy
- c) olyan DNS-szekvenciák kódolják, amelyek az 1a., 1b., 2a. és 2b. szerinti szekvenciával vagy ezeknek a szekvenciáknak fragmenseivel (lásd 4a. és 4b. rajz) az érett proteint kódoló DNS-tartományban hibridizálnak, vagy
- d) olyan DNS-szekvenciák kódolják, amelyek a genetikai kód degenerációja nélkül a b) és c) alatt definiált szekvenciákkal hibridizálnának és azonos aminosav-szekvenciájú polipeptidet kódolnak.



Előnyösek az olyan enzimek, amelyeket az 1a., 1b., 2a. és 2b. ábra szerinti nukleotidok vagy a genetikai kód degenerációja alapján azonos aminosav-szekvenciájú polipeptidet kódolni képes DNS-szekvenciák kódolnak.

A két találmány szerinti enzim (3a. és 3b. ábra szerinti szekvencia) egy- és többsejtű parazitákra, különösen egysejtű parazitákra fajlagos proteineknek új prototipusának tekinthető.

A találmány egyik tárgya nukleinsav-szekvenciák, amelyek az enzimeket kódolják és az alábbi csoportból vannak kiválasztva:

- a) az 1a., 1b., 2a. és 2b. ábrán mutatott DNS-szekvenciák és ezekkel komplementer szekvenciák,
- b) az a) szerinti szekvenciák egyikével hibridizáló nukleinsav-szekvencia
- c) olyan nukleinsav-szekvencia, amely a genetikai kód degenerációja nélkül az a) vagy b) alatt nevezett szekvenciák valamelyikével hibridizálna.

A találmány továbbá tetszőleges parazitából származó enzimekre is vonatkozik, mely enzimek lényegében piruvatot és glicerin-aldehid-3-foszfátot 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfáttá kondenzálnak (DOXP-szintáz), illetve 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfátot 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá alakítanak (DOXP-redukto-izomeráz). Ezek az enzimek a malária-parazitából származó enzimekre analógok és úgy nyerhetők, hogy malária-parazita enzimjét kódoló szekvenciát tartalmazó hibridizációs próbával az adott parazita cDNS-könyvtárát vagy genom-könyvtárát szakember számára ismert módon vizsgáljuk, vagy a malária-parazita enzimjét kódoló DNS- és proteinszekvenciát összehasonlítjuk más parazita enzimjével.

A nukleinsavak segítségével a találmány szerinti enzimek reprodukálható módon és nagy mennyiségben nyerhetők. A prokariota vagy eukariota szervezetekben történő expressió céljából a nukleinsavat szakember számára ismert módon alkalmas expressziós vektorokba integráljuk. Az expressziós vektor előnyösen szabályozha-

tó/indukálható promotort tartalmaz. Expresszió céljából a rekombináns vektorokat ismert módon alkalmas gazdasejtbe juttatjuk, majd a transzformált, transzfektált, illetve transzdukált gazdasejteket a heterológ gén expresszióját lehetővé tevő körülmények között tenyésztjük. A gazdasejt lehet prokariota sejt, például *E. coli*, vagy eukariota sejt, előnyösen élesztősejt, um. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, rovarsejt (például *Drosophila melanogaster* egyik sejtvonala, így S2-sejtek; *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*), emlőssejtvonala, elsősorban teratocarcinoma-sejtvonala, így CHO- vagy COS-sejtek, és növényi sejtvonalak.

A találmány szerinti enzimek transzgenetikus növényekben és állatokban (például egér, juh, kecske, sertés, tengerimalac) exprimálhatók. Ennek során az expressziós rendszert előnyösen szakember számára ismert módon úgy alakítjuk ki, hogy a termelt enzim az állatok tejével együtt választódjék ki, illetve könnyén szedhető növényi részekből (termés, levél, virág, hajtás- és gyökérrészek) nyerhető ki.

Emlőssejtvonala esetén expressziós vektorként előnyösen olyan rendszert alkalmazunk, amely papilloma-vírusból (például SV40), retro-, sindbis-, cytomegalovírus és vakcinia-vírusokból származik. Rovarsejt esetén a bakulo-vírus-rendszer, növényi sejt esetén az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidján alapuló rendszerek, valamint a sejt nukleinsavval bevont részecskékkel végzett bombázása az előnyös.

Különleges jelentősége van a találmány szerinti enzimek nyálkagombákban, így *Dictyostelium discoideum*, *Polysphondylium pallidum* és *Physarium polycephalum* nyálkagombákban történő expressziójának, mert ezek sejtjei nagy mennyiségben egyszerű közegekben olcsón tenyészthetők. A *Dictyostelium discoideum* alkalmazása még azzal az előnnyel is jár, hogy ez a szervezet hasonló kodonokkal kódolja az aminosavakat, mint a *Plasmodium falciparum* parazita, így a találmány szerinti enzimek termelődése különösen hatékony. Emellett *Dictyostelium discoideum*



ban alkalmazható expressziós vektorok számára (például táplalékhiánnyal) indukálható promotorok ismertek. Ezzel a rekombináns enzim hozama tovább növelhető.

A találmány szerinti enzimek expressziójához különösen olyan gazdasejtek és szervezetek alkalmasak, amelyekből hiányoznak azok az enzimek, amelyek piruvatot és glicerín-aldehid-3-foszfátot 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfáttá kondenzálnak (DOXP-szintáz), illetve 1-dezoxi-D-xilulós-5-foszfátot 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá alakítanak (DOXP-redukto-izomeráz). Ez Archebacter, állatok, növények, gombák, nyálkagombák és néhány eubaktériumok esetén áll fenn. Az említett enzimaktivitások hiánya a rekombináns enzimek detektálását és tisztítását lényegesen megkönnyíti. Emellett csak így válik lehetővé a találmány szerinti rekombináns enzimek aktivitásának és különösen az aktivitás gátlásának különböző vegyszerekkel és farmakonokkal a gazdasejtekből készített nyers extraktumban való mérése.

A találmány szerinti enzimek expresszióját előnyösen akkor végezzük eukariota sejtekben, ha transzláció utáni módosulás és a polipeptidlánc natív hajtogatása a cél. Emellett az expressziós rendszertől függően genom-DNS-szekvenciák expressziója esetén az intronok kiesnek, és az enzim a parazitára jellemző polipeptid-szekvenciával termelődik. Intronokat kódoló szekvenciák rekombináns DNS-technológia segítségével is eltávolíthatók az exprimálni kívánt DNS-szekvenciákból, illetve beilleszthetők azokba.

A proteinnek a gazdasejtből vagy a tenyészet felülúszójából történő elkülönítése szakember számára ismert eljárásokkal történhet. Szükség lehet az enzimek *in vitro* újraaktiválására is.

A tisztítás könnyítése céljából a találmány szerinti enzimek vagy azok töredékei különböző peptidláncokkal alkotott fuzió proteinként exprimálhatók. Erre különösen alkalmasak oligo-hisztidin-szekvenciák, valamint a glutation-S-transzferázból, tioredoxinból vagy kalmdulin-kötő peptidekből levezetett szekvenciák. Tioredoxinból



levezetett szekvenciákkal végzett fúzió különösen prokariota expresszió esetén előnyös, mert ez a rekombináns enzim oldhatóságát növeli.

A találmány szerinti enzimek vagy részszekvenciáik olyan (szakember számára ismert) peptidláncokkal alkotott fúziós proteinként exprimálhatók, hogy a rekombináns enzim a sejten kívüli közegbe vagy a gazdasejt meghatározott részébe transzportálódik. Ez mind a tisztítást, mind az enzim biológiai aktivitásának vizsgálatát megkönnyítheti.

A találmány szerinti enzimek expresziója során előnyös lehet, ha egyes kodonokat megváltoztatunk A kódoló régióban lévő egyes bázisok kicserélése a protein optimális szintézisének biztosítására akkor is célszerű, ha a paraziták által használt kodonok a heterológ expressziós rendszer kodonhasználatától eltérőek. Emellett gyakran célszerű nem-transzlatált 5'-, illetve 3'-szakaszok deleciója, például ha a DNS 3'-tartományában több destabilizáló ATTTA-szekvencia-motívum szerepel. Ez esetben ezeket az előnyben részesített eukariota expresszió esetén deletálni előnyös. Az ilyen jellegű módosítások, mint deleció, addíció vagy bázisok csere szintén a jelen találmány tárgyához tartoznak.

A találmány szerinti enzimek továbbá szabványosított körülmények között, szakember számára ismert technikákkal *in vitro* transzlációval nyerhetők. Erre alkalmas rendszerek házinyúl-retikulociták- és búzacsíra-kivonatok. Továbbá *in vitro* átírt mRNS *Xenopus*-oocitákba transzlatálható.

Kémiai szintézis útján olyan oligo- és polipeptidek állíthatók elő, amelyek szekvenciája a találmány szerinti enzimek peptid-szekvenciájában szerepel. A szekvencia alkalmas megválasztása esetén az ilyen peptid olyan tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek a teljes találmány szerinti enzimre jellemzőek. Az ilyen peptidek nagy mennyiségben állíthatók elő, és alkalmasak arra, hogy az enzimaktivitás kinetikáját és szabályozását, az enzimek háromdimenziós szerkezetét, az enzimaktivitás különböző



vegyszerek és farmakonok okozta gátlását, valamint különböző ligandumok kötődési geometriáját a kötődési aktivitását tanulmányozzuk rajtuk.

A találmány szerinti enzimek rekombináns előállítására előnyösen az. 1a., 1b., 2a. és 2b. ábra szerinti nukleotid-szekvenciájú DNS-t vagy a 4a. és 4b. ábra szerinti fragmenseket alkalmazzuk.

A találmány további tárgya eljárás a DOPX-anyagcsereútban részt vevő enzimek, különösen a DOXP-szintáz és a DOXP-redukto-izomeráz enzimek kinyerésére a parazitákból való izolálás útján. Az enzimek izolálása parazita-extraktumokból kromatográfiás, elektroforetikus és egyéb, szakember számára ismert módszerek segítségével történik. Az enzimeket az adott enzimes aktivitás vagy megfelelő antitestekkel való reaktivitás mérésével határozzuk meg.

A rekombinánt enzimeket termelő transzformált, transzfektált illetve transzduktált gazdasejtek kimutatása, valamint a protein tisztítása előnyösen az enzimekhez kötődő antitestek segítségével történik. Ilyen antitestek egyszerű módon, ismert eljárások szerint állíthatók elő úgy, hogy a találmány szerinti enzimeket vagy azok rész-szekvenciáit antigénként vagy immunogénként alkalmazzuk.

A proteinek elleni találmány szerinti antitestekkel például Western-blotting-elemzéssel más paraziták homológ, illetve keresztbe reagáló proteinjeit detektálhatjuk.

A találmány egy további tárgya a DOXP-enzimek, különösen a DOXP-szintáz és a DOXP-redukto-izomeráz enzimes aktivitásának meghatározására szolgáló módszerek. A meghatározás ismert útmutatások szerint történhet (Sprenger és mtsai, PNAS, 94 (1997), 12857-62, és Kuzuyama és mtsai, Tetrahedron Letters 39 (1998), 4509-12). Ennek során piruvat és gliceraldehyd-3-foszfát 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfátot eredményező kondenzálását (DOXP-szintáz), illetve 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá történő átalakulását (DOXP-redukto-

izomeráz) detektáljuk. A jelen találmány további tárgya a fenti mérési módszerek alkalmazása olyan anyagok meghatározására, amelyek az adott enzim aktivitását gátolják.

A rekombináns technológia alkalmazása lehetővé teszi az enzimek vagy töredékek nagy számú változatának az előállítását. Ezek a származékok például egy vagy több aminosav vonatkozásában szubsztituálással, kivágással vagy addicionálással módosítottak lehetnek. A módosítás például helyre fajlagos mutagenézis (site directed mutagenesis) segítségével történhet. Az ilyen variálást szakember minden további nélkül elvégezheti; csak azt kell biztosítani, hogy az enzimek jellemző tulajdonságai megmaradjanak.

A találmány szerinti enzimek és homológjaik segítségével paraziták ellen hatásos új, fajlagos hatóanyagok találhatóak.

A fent leírt detektálási módszerek teszt-kit formájában anyagok antiparazita hatásának kutatására különösen alkalmasak. Ide tartoznak szakember számára ismert és a növény- és állatvilág, növények, algák, baktériumok vagy állatok természetes anyagai, azok származékai, kémiai könyvtárai, ideértve a kombinatorikus kémia segítségével alkotott könyvtárai szűrővizsgálatára alkalmas módszerek (Pindur és mtsai, Pharmazie in unserer Zeit 26 (1997), 24-30; Broach és mtsai, Nature 384 (1997) 14-16, Lack és mtsai, Chimia 50 (1996) 445-447; Czarnik és Ellmann Accounts of chemical research 29 (1996); Chemical and engineering News 74 (1996) 28-73; Lorin és mtsai, Chemical reviews 96 (1996) 555-600; Weber és mtsai, Nachrichten aus der Chemie, Technik und Laboratorium 42 (1994), 698-702).

A találmány proteinek vagy ezek részeinek - enzimikus aktivitással vagy anélkül - alkalmazására is vonatkozik a protein szerkezetének szakember számára ismert technikákkal történő meghatározására, különösen azoknak a kötési helyeknek a jel-



lemzésére, amelyek az enzimaktivitásra gátlóan ható készítmények fejlesztésére alkalmasak.

A találmány szerinti proteinek segítségével talált hatóanyagok igen értékesek a humán gyógyászat és az állatgyógyászat számára.

A találmány szerinti proteinek segítségével talált hatóanyagok melegvérűekre kevésbé toxikusak és alkalmasak embernél és az állattartásban, haszon-, tenyész-, állatkerti, laboratóriumi, kísérleti és háziállatok tartásában tenyésztésében előforduló patogén paraziták leküzdésére. A hatóanyagok a kórokozók egyes vagy összes fejlődési szakasza ellen, valamint rezisztens és érzékeny paraziták ellen egyaránt hatásosak. A paraziták leküzdésével betegségek, elhullás, teljesítménycsökkenés (például hús, tej, gyapjú, bőr, tojás termelésében) csökkenthető, így a hatóanyagok alkalmazása gazdaságosabb és egyszerűbb állattartást tesz lehetővé.

A fenti találmány szerinti eljárások és a már ismert assay-k alkalmazásával sikerült kimutatni, hogy a DOXP-redukto-izomeráz aktivitása 3-(N-acetil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfónát és 3-(N-formil-N-hidroxiamino)-propil-foszfónát (fosmidomicin) alkalmazásával gátolható. A két anyag a acilhidroxilamino-alkilfoszfonsavszármazékok csoportjához tartozik. Ezt a vegyületcsoportot a múltban baktericid és herbicid hatásúnak írták le (US 4693742, DE 2733658). Itt a paraziták ellen hatásos anyagok megtalálására kidolgozott rendszer hatékonysága bebizonyosodott. Az enzim-assay eredményeit a malária-tenyészettel és állatkísérletben is sikerült igazolni (lásd példák). Az enzim-assay segítségével talált inhibitorok a malária-paraziták növekedését *in vitro* is, *in vivo* is gátolták. Állatok 8 napon át folytatott kezelése az állatok gyógyulásával végződött. Ebben a kísérletben az acetil-származék hatása háromszorosan felülmúlta a formil-származékét. Ez az eredmény igen meglepő, mert lényegesen nagyobb (x 1000-ig) 3-(N-acetil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfónát-koncentráció szükséges baktériumok növekedésének gátlásához.



A fentiek alapján a találmány szerinti eljárás hatóanyagok azonosítására és a találmány szerinti hatóanyagok alkalmasak paraziták, gombák vagy vírusok emberben, állatban okozta betegségek megelőzésére és kezelésére. A vegyületek az alábbi betegségek megelőzésére és kezelésére alkalmazhatók: malária, álomkór, chagas-kór, toxoplazmózis, amőbavérhas, leishmaniózis, trichomoniázis, pneumocisztózis, balantidiózis, kriptosporidiózis, szarkocisztózis, akantoamőbózis, naeglerózis, kokcidiózis, giardiózis és lambliózis.

A találmány szerinti eljárás és a találmány szerinti hatóanyagok különösen a malária, az álomkór és a leishmaniózis kezelésére alkalmasak.

A találmány szerinti hatóanyagok baktériumok és növények anyagcsere-útjának gátlására is alkalmazhatók. Ezzel a találmány szerint a DOXP-anyagcsereút inhibitoraiként azonosított anyagok herbicidként, valamint ember és állat baktériumos fertőzése ellen is alkalmazhatók.

A kezelésre alkalmas haszon- és tenyészállatok lehetnek emlősek, például szarvasmarha, ló, juh, sertés, kecske, teve, vizibölény, samar, házinyúl; édes- és sós-vízű halak, például pisztráng, ponty és angolna; laboratóriumi és kísérleti állatok, így egerek, patkányok, tengerimalacok, aranyhórcsög, kutya, macska. Az alkalmazás lehet megelőző vagy terápiás jellegű. Az anyagok közvetlenül vagy alkalmas, szakember számára ismert készítmény, például enterálisan, parenterálisan, dermálisan vagy nazálisan alkalmazható készítmény formájában alkalmazhatók.

A találmány szerinti hatóanyagok az összes ismert fertőzés elleni hatóanyaggal kombinálhatók. Ide tartoznak baktériumok, paraziták, vírusok vagy gombák ellen hatásos anyagok. Ezeket a fertőzés ellen hatásos anyagokat a Vöröslista és a szakirodalom (Forth és mtsai: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim 1998; Simon és Stille: *Antibiotikatherapie*, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1993) részletezi.

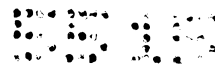


Tekintettel arra, hogy néhány parazita mind a mevalonát-, mind a DOXP-anyagcsereúttal rendelkezik, a találmány továbbá a DOXP-anyagcsereút-inhibitorok és a zsíryanagcsereutat, lipidek szintézisét vagy felszívódását gátló inhibitorok, különösen a mevalonát-anyagcsereút-inhibitorok kombinációjára is vonatkozik. Itt különösen a HMG-CoA-szintáz enzim és a HMG-CoA-reduktáz enzim inhibitorait említjük. A HMG-CoA-reduktáz inhibitoraihoz lovastatin és származékai, mevastatin és származékai, kompaktin és származékai, simvastatin és származékai, pravastatin és származékai, atorvastatin és származékai, fluvastatin és származékai és cerivastatin és származékai.

1. példa

P. falciparum DOXP-redukto-izomerázt kódoló génjének expressziós klónozása

A *P. falciparum* DOXP-redukto-izomeráz enzimjét kódoló gén klónozása a genom-DNS megfelelő szekvenciáit matricaként alkalmazó PCR-amplifikációval történt. Genom-DNS kinyerésére a *P. falciparum* HB3 törzset a gyertyafazék-módszer (Tranger és Jensen (1976) Science193, 673-675) szerint tenyésztettük. A közeg RPMI 1640 volt (HEPES és L-glutamin tartalmú, gyártja: Gibco), 10 % humán szérummal, 0,3 µg/ml gentamicinnel és 0,1 mM hipoxantinnel kiegészítve. A hematokrit-koncentrációt humán eritrocitákkal 5 %-ra állítottuk be. A DNS kinyerésére 15 tálcát alkalmaztunk, mindegyikben 35 ml tenyészet, 4 % parazitémia mellett. A fertőzött eritrocitákat centrifugálással elválasztottuk, Trager féle pufferrel (57 mM NaCl, 58 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 7 mM K₂HPO₄, 11 mM NaHCO₃, 14 mM glükóz) kétszer mossuk. A parazitákat úgy szabadítottuk fel az eritrocitákból, hogy a sejtüledéket a tízszeres térfogatú 1 %-os szaponin-oldattal (a fenti pufferrel készült) jégen 5 perc alatt lizáltuk (Kilejian (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4650-4653 eljárása, módosítva). A szabad parazitákat kétszer 1 % BSA Trager-pufferrel készített



oldatával mostuk, majd centrifugáltuk (10 perc, fordulatszám 10 000 perc⁻¹, 4 °C). A szabad parazitákból a DNS-t szabvány jegyzőkönyvek szerint nyertük ki. Először a parazitákat proteináz K enzimmel emésztettük, majd fenol/kloroformmal 4x extraháztuk, a DNS-oldatot egy éjszakán át TE-vel szemben dializáltuk, majd a DNS-t izopropanollal kicsaptuk.

A PCR-amplifikációhoz az alábbi primereket alkalmaztuk:

PfYAEMfor 5'-CTGAATTTTCATATTACAAAATTAATAGATG-3'

PfYAEMrev 5'-GTACTATGAAGAATTATGTTTGTGTATAT-3'.

A PCR-reakció közege az alábbi volt:

3 µl 10 x PCR-puffer

2,4 µl 25 mM MgSO₄

2,4 µl 2,5 mM dNTP

2 µl matrica-DNS (0,2 µg/ml)

2 µl 1. primer (7,5 µM)

2 µl 2. primer (7,5 µM)

0,2 µl Taq-polimeráz (5 E/µl)

16 µl H₂O

Az amplifikáció az alábbi profillal történt:

3 ciklus: 96 °C 1 perc

48 °C 1 perc

72 °C 3 perc

32 ciklus: 95 °C 40 mp

48 °C 1 perc

72 °C 3 perc.



Az utolsó ciklus után az elegyet az összes termék teljes meghosszabítása céljából 72 °C-on még 10 percig inkubáltuk. Négy ilyen elegy PCR-termékét egyesítettük és 0,7 %-os agaróz-gélen tisztítottuk. Az agaróz-tömbökből a DNS-t a „Kit for DNS extraction” (Millipore, Kat. Nr. S 667) segítségével eluáltuk. Az eluált DNS-t etanollal kicsaptuk és 10 µl vízben felvettük. Ezt követően a PCR-terméket a TA-cloning kit (Invitrogen) segítségével a gyártó előírása szerint klónoztuk. Egy ligációs elegyhez 20 mg inzert-DNS-t alkalmaztunk. A kívánt rekombináns plazmidot hordozó baktériumtelepeket analitikus plazmid-preparálással, majd a plazmidok EcoRI enzimmal végzett emésztésével azonosítottuk. A klónozott PCR-termékeket szabvány Forward- és Reverse-primerek alkalmazásával szekvenáltuk; a szekvenciákat a primer walking technikájával kiegészítettük.

A COS-7-sejtekben történő expresszió céljából egy, a pCR2.1-vektorban megfelelő orientációval jelen lévő PCR-terméket a pBK-CMV expressziós vektorba (Stratagene) átklónoztunk. Az átklónozás a NotI és BamHI restriktív enzimek vágóhelyei mentén történt, mert ezek mindkét vektor polilinkerében előfordulnak. A COS-7-sejtek transzfekcióhoz inzertként a PCR-terméket tartalmazó expressziós vektort anion-csere kromatográfiás eljárással (Qiagen) preparatív mennyiségben állítottuk elő. A klónozáshoz használt összes módszert J. Sambrook, E.F. Fritsch és T. Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual” című könyve (2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989) részletesen tárgyalja.

A COS-7-sejteket 10 % FCS-t tartalmazó DMEM-közegben szabvány körülmények között tenyésztettük. Egy sejtenyésztési üvegre 30 ml közeget alkalmaztunk. A transzfekcióhoz kb. 50 %-os konfluenza mellett előző napon fissen hasított sejteket alkalmaztunk. A transzfekciós reagens DOTAP (Boehringer) volt. 40 µl DNS-oldatot (0,5 µg/ml) 110 µl 20 mM HEPES pufferrel (pH 7,4) polisztirolból álló reakcióedényben összekevertünk. Utána a DNS-oldatot a DOTAP-oldathoz pipettáltuk és



az elegyet szobahőmérsékleten 15 percen át inkubáltuk. Az elegyhez még 20 ml tenyésztési közeget adtunk, és az így kapott eleggyel a COS-7-sejtek közegét kicseréltük. A következő napon a sejteket friss közeggel új sejtenyésztési üvegekbe vittük át. További 48 órás inkubálás után a transzfektált sejteket lekapartuk, és assay-pufferben (100 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM MnCl₂) centrifugálva háromszor mostuk. A sejteket minimális térfogatú assay-pufferben újból szuszpendáltuk és folyékony nitrogénben háromszor lefagyasztva, majd felolvasztva feltártuk. A sejtfragmenseket 1,5 ml-es reakcióedényben centrifugáltuk, a felülúszót közvetlenül az enzimaktivitás méréséhez, illetve az enzim tisztításához használtuk fel.

2. példa

P. falciparum rekombináns DOXP-redukto-izomerázának tisztítása

A pontosabb jellemzés érdekében a *P. falciparum* COS-7-sejtekben exprimált rekombináns DOXP-redukto-izomeráz enzimjét közel homogénre tisztítottuk. A tisztítás egy affinitáskromatográfiás és egy gélpermeációs kromatográfiás lépésen át történt.

Alkalmas affinitáskromatográfiás oszlop előállítására először *P. falciparum* rekombináns DOXP-redukto-izomeráz enzimje elleni antitesteket állítottuk elő. E célból a DNS-szekvenciából levezetett aminosav-szekvenciából olyan szakaszokat választottunk ki, amelyekre különösen nagy antigén hatás volt jósolható. A megfelelő peptideket szintetizáltuk és házinyúlak immunizálására használtuk. A kapott antiszérumok minőségét mind a szintetikus peptidekkel való reaktivitásuk alapján, mind Western-blot-elemzéssel igazoltuk. A Western-blot-elemzéshez (BM Western Blotting Kit, Boehringer) *P. falciparum* és rekombináns COS-sejtek extraktumait használtuk.

Az affinitáskromatográfiás oszlop előállítására az antiszérumot a kis móltömegű részek eltávolítása céljából PBS ellen dializáltuk. Utána az antitesteket



protein-A-szefarózhhoz kötöttük és DMP-vel végzett cross-linking útján kovalensen kapcsoltuk (IgG Orientation Kit, Pierce). A proteinkivonatot az 1. példában leírt módszerrel 55 sejttenyésztési üveg transzfektált COS-7-sejtjeiből nyertük és az assay-pufferrel kiegyenlített oszlopra felvittük. Az oszlopot assay-pufferrel igen alaposan mostuk, majd eluáló pufferrel (100 mM glicinHCl (pH 2,8) 0,4 % CHAPS) eluáltuk. Az eluátumot azonnal 1 M TrisHCl (pH 7,5) pufferrel semlegesítettük. A főfrakciót Western-blot-elemzéssel azonosítottuk. A detektáláshoz biotinilezett antitesteket alkalmaztunk, hogy az oszlopról esetleg kis mennyiségben eluált antitest zavaró hatását kiküszöböljük. A főfrakciókat egyesítettük, assay-pufferrel szemben dializáltuk és ultaszűréssel (30 kDa, Amicon) betöményítettük. A további tisztítás gélpermeációs kromatográfiásan (Superdex 200, Pharmacia) történt, start- és eluáló pufferként assay-pufferrel. A főfrakciókat a fent leírtak szerint azonosítottuk, egyesítettük és betöményítettük, majd 20 % glicerint adtunk hozzá és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on befagyasztottuk. Redukáló körülmények között SDS-PAGE (12 % akrilamid) és ezüstfestés (Gelcode Copour Silver Stain Kit, Pierce) alkalmazásával *P. falciparum* tisztított DOXP-redukto-izomeráz enzimjét 54 kDa megjelenő egységes sávként jelenítettük meg.

3. példa

A tisztított enzim aktivitásának meghatározása és szűrővizsgálat inhibitorok megtalálása céljából

A tisztított enzim DOXP-redukto-izomeráz-aktivitását *in vitro* kísérleti rendszerben igazoltuk. Tipikus kísérleti elegy: 0,3 mM NADPH-t tartalmazó 100 μl assay-puffer, 0,3 mM DOXP és 10 μg rekombináns enzim. A reakciót a komplett elegyhez DOXP-t adva indítjuk. Az NADPH oxidálását fotometriásan 340 nm-en, mikrovarcküvetében, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on követtük. Ezt a kísérleti rendszert azért választottuk, hogy a *P. falciparum* DOXP-redukto-izomeráz enzimjének különböző anyagok hatá-

sára bekövetkező gátlását lehessen kimutatni. A reakcióelegyhez $1 \mu\text{M}$ 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsót és $1 \mu\text{M}$ 3-(N-acetil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsót adagoltuk, a 340 nm-nél az abszorpció nem változott. A fenti körülmények között *P. falciparum* DOXP-redukto-izomeráz enzimje teljesen gátolt.

4. példa

Az anyagok malária elleni hatékonyságának *in vivo* vizsgálata

A különböző származékokat a módosított Peter's teszttel vizsgáltuk. Az anyagokat a halálos dózis (LD50) felének egynegyed részét kitevő dózisban alkalmaztuk. Tíz egeret *Plasmodium vinckei*-vel, az egérmalária kórokozójával fertőztünk. Műtán vérvizsgálattal a fertőzés megtörténtéről meggyőződünk, négy egeret kezeltünk, a hat kezeletlen egér a kontroll volt. A $1-1000 \text{ mg/kg} \cdot \text{nap}$ 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsóval végzett kezelés az egerek vérében a parazitákat elpusztította. A kezelt csoport már egy nap elteltével élő parazitáktól mentes volt. A kontrollcsoport állatai a fertőzés utáni 5. napon $> 80\%$ -os parazitémia mellett le kellett ölni. A kezelt egerek a kezelés utáni 8. hétben még mindig mentesek voltak parazitáktól. További kísérletek azt mutatták, hogy $50 \text{ mg/kg} \cdot \text{nap}$ 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó hatásos 80% parazitémiás egerekben. Ezek az egerek is egy nap elteltével mentesek voltak élő parazitáktól. A 3-(N-formil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsóval és 3-(N-acetil-N-hidroxi-amino)-propil-foszfonsav-mononátriumsóval kapott további eredményeket az 5. ábra mutatja.

5. példa

Malária elleni védőhatás fertőzött egerekkel végzett kísérletben

A vegyületek malária elleni *in vivo* hatékonyságát 20-25 g testtömegű hím-nemű egereken (BALB/c-törzs) vizsgáltuk. A fertőzés előtt egy nappal négy egérnek

intraperitoneálisan beadunk 50 mg/kg · nap dózisban 3-(N-formil-N-hidroxiamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsót. Utána az egereket Plasmodium vinckei vel megfertőztük. A vegyülettel nem kezelt egerek alkották a kontrollcsoportot. A kezelt egerekben fertőzés nem volt kimutatható, míg a kontrollegereket > 80% parazitémiával az 5. napon leöltük. A kezelt egerek a fertőzés után 8 héttel még mindig mentesek voltak parazitáktól.

6. példa

Malária-paraziták növekedésének *in vitro* gátlása

Az IC₅₀ (a paraziták vitalitását a felére csökkentő koncentráció) meghatározásának elve

Az IC₅₀-értékek meghatározására a malária-parazitákat először egy teljes 48-órás cikluson át inhibitorok jelenlétében inkubáljuk, a következő 24 órában [³H]-hipoxantin beépülése alapján megmérjük a túlélési hányadot. Mikrotiterlemezen 3-(N-formil-N-hidroxiamino)-propil-foszfonsav-mononátriumsó hígítási sorát készítjük 10-szeres koncentrációjú 20 µl-es felülúszóként. Mindegyik lyukba 180 µl parazitaszuszpenziót adunk (tenyésztési közegben szuszpendált). Kb. 0,4 % parazitémiás, 0,2 % hematokritos aszinkron tenyészeteket alkalmazunk. A mikrotiterlemezeket 48 órán át inkubáljuk. Utána mindegyik lyukba 30 µl [³H]-hipoxantint adunk, majd 24 óra elteltével a sejteket elkülönítjük és az inkorporált radioaktivitást mérjük. A 6a., 6b. és 6c. ábrákon a HB3, A2 illetve Dd2 törzssel (ezek a törzsek más maláriagyógyszerekkel szemben rezisztensek) kapott eredményeket tüntettük fel. Az IC₅₀-értékek 0,5 µM alatti. A törzsek rezisztenciája:

Plasmodium falciparum HB3 (Honduras) pirimetaminnal szemben rezisztens.

Plasmodium falciparum Dd2 (Indokína) Cloroquin, kinin, pirimetamin, cikloguanil és szulfadoxin ellen rezisztens.

Plasmodium falciparum A2 (Gambia) Cloroquin és cikloguanil ellen rezisztens.



Malária elleni gyógyszerekkel keresztrezisztenciát nem találtunk.



1. Eljárás egy- vagy többsejtű paraziták okozta megbetegedések kezelésére alkalmas hatóanyagok megtalálására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát anyagcsereúton részt vevő proteinek vagy azonos hatású származékaikat a paraziták elleni hatására vizsgálni kívánt anyagokkal érintkeztetjük, majd a proteinek vagy származékaikat gátló anyagokat kiválasztjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteinek az alábbi a)...i) lépések legalább egyikében részt vesznek:

- a) glicerin-aldehid és piruvat reakciója 1-dezoxi-D-xilulózzá,
- b) glicerin-aldehid-3-foszfát és piruvat reakciója izopentenil-difoszfáttá,
- c) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát képződése,
- d) glicerin-aldehid-3-foszfát és piruvat reakciója 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfáttá,
- e) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát átalakulása,
- f) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát képződése,
- g) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá alakulása,
- h) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát átalakulása,
- i) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát izopentenil-difoszfáttá alakulása.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyag a részt vevő enzimek vagy részt vevőkofaktorok termelését, különösen az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz vagy az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-redukto-izomeráz enzimek átalakulását gátolja vagy a részt vevő enzimek vagy részt vevő kofaktorok lebontását elősegíti.

4. 1-Dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz aktivitással rendelkező vagy nem rendelkező protein, amely az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-anyagcsereúton részt vesz és amelyet a) az 1b. és 2b. ábra szerinti DNS-szekvencia kódol vagy b) az 1b. vagy 2b.



ábra szerinti DNS-szekvenciával vagy e szekvenciák fragmenseivel az érett proteint kódoló DNS-tartományban hibridizáló DNS-szekvenciák kódolnak

5. 1-Dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-redukto-izomeráz aktivitással rendelkező vagy nem rendelkező protein, amely az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-anyagcsereúton részt vesz és amelyet a) az 1a.vagy 2a. ábra szerinti DNS-szekvencia kódol vagy b) az 1a. vagy 2a. ábra szerinti DNS-szekvenciával vagy e DNS-szekvenciák fragmenseivel az érett proteint kódoló DNS-tartományban hibridizáló DNS-szekvenciák kódolnak.

6. A 4. vagy 5. igénypont szerinti protein vagy egyéb, az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-anyagcsereútban részt vevő proteinek, *azzal jellemezve*, hogy paraziták felülúszójából vagy feltárt parazitákból kromatográfias és elektroforetikus technikákkal végzett tisztítással állíthatók elő.

7. A 4-6. igénypontok bármelyike szerinti protein, *azzal jellemezve*,

- a) exogén DNS prokariota vagy eukariota expressiójának terméke,
- b) az 1a., 1b., 2a. vagy 2b. szerinti szekvencia kódolja, vagy olyan DNS-szekvenciák kódolják, amelyek az 1a., 1b., 2a. és 2b. szerinti szekvenciával vagy ezeknek a szekvenciáknak fragmenseivel az érett proteint kódoló DNS-tartományban hibridizálnak, vagy
- c) olyan DNS-szekvenciák kódolják, amelyek a genetikai kód degenerációja nélkül a b) alatt definiált szekvenciákkal hibridizálnának és azonos aminosav-szekvenciájú polipeptidet kódolnak.

8. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti protein, *azzal jellemezve*, hogy a 2a., 2b., 3a. vagy 3b. szekvencia szerinti aminosavakból áll.

9. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti protein, *azzal jellemezve*, hogy 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz vagy 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-redukto-izomeráz.



10. Nukleinsavszekvencia, amely a 4-9. igénypontok bármelyike szerinti proteinek valamelyikét kódolja, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi csoportból vannak kiválasztva:

- a) az 1a., 1b., 2a. és 2b. ábrán mutatott DNS-szekvenciák és ezekkel komplementer szekvenciák,
- b) az a) szerinti szekvenciával hibridizáló nukleinsav-szekvencia,
- c) olyan nukleinsav-szekvencia, amely a genetikai kód degenerációja nélkül az a) vagy b) alatt nevezett szekvenciák valamelyikével hibridizálna.

11. DNS, *azzal jellemezve*, hogy szekvenciája az 1a., 1b., 2a. vagy 2b. ábrán mutatott szekvenciának felel meg.

12. Rekombináns expressziós vektor, amely egy, a 4-6. igénypontok bármelyike szerinti proteinek valamelyikét kódoló DNS-t tartalmaz és transzformált mikroorganizmusban vagy transzformált eukariota sejtben vagy állatban vagy növényben a proteint kódoló DNS-t exprimálja.

13. Gazdasejt, különösen prokariota gazdasejt, eukariota gazdasejt, állatok és növények, amelyek egy, a 4-6. igénypontok bármelyike szerinti proteinek valamelyikét kódoló DNS-sel transzformáltak és az említett proteint képesek termelni.

14. A 13. igénypont szerinti gazdasejt, amely E. coli vagy emlőssejtvonal.

15. A 4-6. igénypontok bármelyike szerinti proteinek valamelyikét kódoló DNS alkalmazása prokariota vagy eukariota szervezet transzfektálására

16. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteint parazitákból vagy parazitatenyészet felülúszójából kromatográfias és elektroforetikus technikákkal végzett tisztítással állítjuk elő.

17. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a proteint a 4-9. igénypontok bármelyike szerinti proteinek valamelyikét kódoló DNS



alkalmas gazdasejtben végzett exprimálásával állítjuk elő, majd a gazdasejtből vagy annak felülúszójából kinyerjük.

18. A 4-8. igénypontok bármelyike szerinti, az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát anyagcsereútban részt vevő protein antigénkénti vagy immunogénkénti alkalmazása az említett proteinhez kötődő antitestek előállítására.

19. A 4-9. igénypontok bármelyike szerinti, az 1-dezoxi-D-xilulóz-anyagcsereútban részt vevő protein elleni antitest, előállítható *in vitro* immunizálási technikával vagy állatnak az előző igénypontok bármelyike szerinti proteinnel végzett immunizálásával és az antitesteknek az immunizált állat szérumából vagy lépsejtjeiből történő kinyerésével.

20. A 4-9. igénypontok bármelyike szerinti protein alkalmazása paraziták ellen hatásos anyag azonosítására.

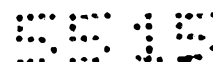
21. A 19. igénypont szerinti antitest alkalmazása paraziták ellen hatásos anyag azonosítására.

22. Eljárás a 4-9. igénypontok bármelyike szerinti proteint kódoló nukleinsavszekvencia kimutatására, *azzal jellemezve*, hogy a vizsgálni kívánt mintát olyan nukleinsavszondával inkubáljuk, amely az alábbi csoportból kiválasztott:

- a) az 1a. és 1b. ábrán mutatott DNS-szekvenciák vagy az ezekkel komplementer szekvenciák,
- b) az a) alatt megnevezett szekvenciák egyikével hibridizáló nukleinsavszekvenciák,

a nukleinsavszondát a minta nukleinsavával inkubáljuk és a hibridizálást - adott esetben a nukleinsavszonda egy további kötési partnerén keresztül - kimutatjuk

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kimutatni kívánt nukleinsavszekvenciát a kimutatás előtt amplifikáljuk.



24. Tesztrendszerek az előző igénypontok bármelyike szerinti proteín alkalmazásával, paraziták ellen hatásos anyag azonosítására.

25. Hatóanyag egy vagy többsejtű paraziták okozta fertőző betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 24. igénypont szerinti tesztrendszerrel lesz azonosítva.

26. Hatóanyag herbicid készítmény vagy baktériumok okozta fertőző betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 24. igénypont szerinti tesztrendszerrel lesz azonosítva.

27. Hatóanyag egy vagy többsejtű paraziták okozta fertőző betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-anyagcsereút enzimjeit vagy kofaktorait gátolja.

28. A 25. vagy 27. igénypont szerinti hatóanyag, *azzal jellemezve*, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi a)...i) lépések legalább egyikét gátolja:

- a) gliceraldehid és piruvat reakciója 1-dezoxi-D-xilulózzá,
- b) glicerin-aldehid-3-foszfát és piruvat reakciója izopentenil-difoszfáttá,
- c) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát képződése,
- d) glicerin-aldehid-3-foszfát és piruvat reakciója 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfáttá,
- e) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát átalakulása,
- f) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát képződése,
- g) 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfáttá alakulása,
- h) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát átalakulása,
- i) 2-C-metil-D-eritritol-4-foszfát izopentenil-difoszfáttá alakulása.

29. A 25., 27. vagy 28. igénypontok bármelyike szerinti hatóanyag, *azzal jellemezve*, hogy a részt vevő enzimek vagy részt vevő kofaktorok termelését, különösen az 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-szintáz vagy 1-dezoxi-D-xilulóz-5-foszfát-



redukto-izomeráz enzimeket gátolja vagy a részt vevő enzimek vagy részt vevő kofaktorok lebontását elősegíti.

30. A 25-27. szerinti hatóanyag, *azzal jellemezve*, hogy 3-(N-acetil-N-hidroxiamino)-propil-foszfónát vagy 3-(N-formil-N-hidroxiamino)-propil-foszfónát.

31. A 25., valamint 27-30. igénypontok bármelyike szerinti hatóanyag alkalmazása egy- vagy többsejtű paraziták okozta fertőző betegségek, különösen malária, álomkór és leishmaniózis kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására.

32. A 31. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a gyógyszerkészítmény továbbá a zsíryanagcsereutakat, a koleszterin-szintézist, a koleszterinfel szívódást gátlók csoportjából egy vagy több anyagot tartalmaz.

33. A 32. igénypont szerinti alkalmazás, *azzal jellemezve*, hogy a zsíryanagcsereutakat gátló anyag HMG-CoA-reduktáz-gátló vagy HMG-CoA-szintáz-gátló, előnyösen lovastatin, mevastatin, kompaktin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, fluvastatin és/vagy cerivastatin.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabaddalmi és Védjegy Iroda Kft.
5.

294 20-49 eldó

Q f A

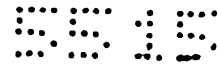
2001.07.17.

ATGAAGAAATATATTTATATATATTTTTCTTCATCACAAT
AACTATTAATGATTTAGTAATAAATAACATCAAAATGTGTTCCATTG
AAAGAAGAAAAATAACGCATATATAAATTATGGTATAGGATATAATGGA
CCAGATAATAAAATAACAAAGAGTAGAAGATGTAAAAGAATAAAGTTATG
CAAAAAGGATTTAATAGATATTGGTGCAATAAAGAAACCAATTAATGTAG
CAATTTTTGGAAGTACTGGTAGTATAGGTACGAATGCTTTAAATATAATA
AGGGAGTGTAAATAAAATTGAAAATGTTTTAATGTTAAAGCATTGTATGT
GAATAAGAGTGTGAATGAATTATATGAACAAGCTAGAGAATTTTTACCAG
AATATTTGTGTATACATGATAAAAGTGTATATGAAGAATTAAAAGAAGT
GTAAAAAATATAAAAGATTATAAACCTATAATATTGTGTGGTGATGAAGG
GATGAAAGAAATATGTAGTAGTAATAGTATAGATAAAATAGTTATTGGTA
TTGATTTCTTTCAAGGATTATATTCTACTATGTATGCAATTATGAATAAT
AAAATAGTTGCGTTAGCTAATAAAGAATCCATTGTCTCTGCTGGTTTCTT
TTTAAAGAAATTATTAATATTCATAAAAATGCAAAGATAATACCTGTTG
ATTCAGAACATAGTGCTATATTTCAATGTTTAGATAATAATAAGGTATTA
AAAACAAAATGTTTACAAGACAATTTTTCTAAAATTAACAATATAAATAA
AATATTTTTATGTTTCATCTGGAGGTCCATTTCAAATTTAACTATGGACG
AATTA AAAAATGTAACATCAGAAAATGCTTTAAAGCATCCTAAATGGAAA
ATGGGTAAGAAAATAACTATAGATTCTGCAACTATGATGAATAAAGGTTT
AGAGGTTATAGAAACCCATTTTTTATTTGATGTAGATTATAATGATATAG
AAGTTATAGTACATAAAGAATGCATTATACATTCTTGTGTTGAATTTATA
GACAAATCAGTAATAAGTCAAATGTATTATCCAGATATGCAAATACCCAT
ATTATATTCTTTAACATGGCCTGATAGAATAAAAACAAATTTAAAACCTT
TAGATTTGGCTCAGGTTTCAACTCTTACATTTCATAAACCTTCTTTAGAA
CATTTC CCGTGTATTA AATTAGCTTATCAAGCAGGTATAAAAGGAACTT
TTATCCAACGTACTAAATGCGTCAAATGAAATAGCTAACAACTTATTTT
TGAATAATAAAATTA AATATTTTGATATTTCTCTATAATATCGCAAGTT
CTTGAATCTTTCAATTCTCAAAGGTTTCGGAAAATAGTGAAGATTTAAT
GAAGCAAATCTACAAATACATTCTTGGGCCAAAGATAAAGCTACCGATA
TATACAACAAACATAATTCTTCATAG

1a. ábra

GGTAATATACGTATAATATATATATAATATATTCCTTACGTATGTATCATT
TATGAATCATAATAATATTCTAAATTTACCTTCCGTTTTTGCTCGATCTT
CTCATTTCGTTTCAGCTTTTATCAATGATTTTTAATTATGTGTTTTTTA
AGAACTTTGTACCAGTTGTTCTATACATTCTCCTTATAATATATATTAAC
TTAAATGGCATGAATAATAAAAATCAAATAAAAACAGAAAAAATTTATAT
AAAGAAATTGAATAGGTTGTCAAGGAAAAATTCGTTATGTAGTTCTAAAA
ATAAAATAGCATGCTTGTTTCGATATAGGAAATGATGATAATAGAAATACG
ACATATGGCTATAATGTGAATGTTAAAAATGATGATATTAATTCCTTACT
AAAAATAATTATAGTAATAAATTGTACATGGATAAGAGGAAAAATATTA
ATAATGTAATTAGTACTAATAAAATATCTGGGTCCATTTCAAATATTTGT
AGTAGAAATCAAAAAGAAAATGAACAAAAAGAAAATAAACAAAGATGTTT
AACTCAATGTCACACTTATAATATGTCACATGAACAGGACAAACTAGCTA
ATGATAATAATAGGAATAATAAAAAGAATTTTAATTTATTATTTATAAAT
TATTTTAATTTGAAACGAATGAAAAATTCCTCTCTAAATAAAGACAATTT
CTTTTACTGTAAAGAAAAAAATTTGTCATTTCTGCATAAGGCCTATAAAA
AAAAAAATTGCACTTTTCAAATTATAGTTTAAAAAGAAAATCTAATCGT
GATTCACATAAATTGTTTTCTGGAGAATTTGACGATTATACAAATAATAA
TGCTTTATATGAATCCGAAAAAAAAGAATACATTACACTAAATAATAATA
ATAAAAAATAATAATAATAAAATAATGATAATAAAAAATAATGATAATAAT
GATTATAATAATAATAATAGTTGTAATAATTTAGGAGAGAGATCCAATCA
TTATGATAATTATGGTGGAGATAATAATAATCCATGTAATAATAATAATG
ACAAATATGATATAGGAAAATATTTCAAACAGATTAATACCTTTATTAAT
ATTGATGAATATAAACTATATATGGTGATGAAATATATAAAGAAATATA
TGAECTATATGTAGAAAGAAATATTCCTGAATATTATGAACGAAAATATT
TTTCAGAAGATATTA AAAAGAGTGTCCATTTGATATAGATAAATATAAT
GATGTCGAATTTGAAAAGCTATAAAAAGAAGAATTTATAAATAATGGAGT
TTATATTAATAATATAGATAATACATATTATAAAAAAGAAAATATTTTAA
TAATGAAAAGATATTACATTAATTTCCATTATTAAAATTAATTAATAAT
CCATCAGATTTAAAAAAGTTAAAAAACAATATTTACCTTTATTAGCACA
TGAATTA AAAATATTTTTATTTTTTATTGTAAATATAACAGGAGGTCATT
TTTCTCTGTTTTAAGCTCTTTAGAAATTC AATTATTATTATTGTATATT
TTTAATCAACCATATGATAATGTTATATATGATATAGGACATCAAGCATA
TGTAATAAGATATTGACCGGAAGAAA ACTATTATTTCTATCATTAAAGAA
ATAAAAAAGGTATTAGTGGATTCC TAAATATTTTTGAAAGTATTTATGAT
AAATTTGGGGCTGGTCCAGTTC CACTTCATTAAGTGCTATACAAGGATA
TTATGAAGCCGAGTGGCAAGTGAAGAATAAAGAAAAATATGGAAATGGAG
ATATAGAAATAAGTGATAACGCAAATGTCACGAATAATGAAAGGATATTT
CAAAAAGGAATACACAATGATAATAATATTAACAATAATATTAATAATAA
TAATTATATCAATCCTTCAGATGTGGTAGGAAGAGAAAATACGAATGTAC
CAAATGTACGAAATGATAACCATAACGTGGATAAAGTACACATTGCTATT
ATAGGAGATGGTGGTTAACAGGTGGAATGGCATTAGAAGCGTTAAATTA
TATTTCAATCTTGAATTCTAAAATTTTAATTATTTATAATGATAACGGAC
AAGTTTCTTTACCAACAAATGCCGTAAGTATATCAGGTAATAGACCTATA
GGTTCTATATCAGATCATT TACATTATTTGTTTCTAATATAGAAGCAA
TGCTGGTGATAATAAATTATCGAAAAATGCAAAAAGAGAATAACATTTTGG
AAAATTTGAATTATGATTATATTGGTGTGTGAATGGTAATAATACAGAA

1b. ábra 1. része



GAGCTCTTTAAAGTATTAAATAATATAAAAGAAAATAAATTAAAAAGAGC
TACTGTTCTTCATGTACGTACAAAAAATCGAATGATTTTATAAATTCAA
AGAGTCCAATAAGTATATTGCACTCTATAAAGAAAAATGAGATTTTCCCT
TTCGATACCACTATATTAAATGGAAATATTCATAAGGAGAACAAGATAGA
AGAAGAGAAAAATGTGTCTTCATCTACAAAGTATGATGTAAATAATAAGA
ATAATAAAAAATAATGATAATAGTGAAATTATAAAATATGAAGATATGTTT
TCAAAAGAGACGTTTACAGATATATATACAAATGAAATGTTAAAAATATTT
AAAGAAAGATAGAAATATAATATTCCCTATCTCCCGCTATGTTAGGAGGAT
CAGGATTGGTTAAAAATTAGTGAGCGTTATCCAAATAATGTATATGATGTA
GGTATAGCAGAACAACATTCTGTAACCTTCGCAGCAGCTATGGCAATGAA
TAAGAAATTA AAAATACAATTATGTATATATTCGACCTTTTACAAAGAG
CATATGATCAAATTATACATGATCTTAATTTACAAAATATACCTTTAAAG
GTTATAATTGGAAGAAGTGGATTAGTAGGAGAGGATGGGGCAACACATCA
AGGTATATATGATTTATCTTATCTTGGGACACTTAACAATGCATATATAA
TATCTCCAAGTAATCAAGTTGATTTGAAAAGAGCTCTTAGGTTTGCTTAT
TTAGATAAGGACCATTCTGTGTATATACGTATACCCAGAATGAACATATT
AAGTGATAAGTACATGAAAGGATATTTGAACATTCATATGAAAAATGAGA
GCAAAAATATCGATGTAAACGTGGATATAAACGATGATGTAGATAAATAT
AGTGAAGAATATATGGACGATGATAATTTTATAAAATCGTTTATTGGAAA
ATCTAGAATTATTAAATGGATAATGAAAATAATAATACAAATGAACATT
ATCAAGCAGAGGAGATACACAGACAAAAAAAAAAAAAGTTTGTATCTTT
AACATGGGTAGTATGCTTTTTAATGTAATTAATGCTATAAAAGAAATTGA
AAAAGAACAATATATTTACATAATTATTCTTTTTCAATTGTTGATATGA
TATTTTTAAATCCTTTAGATAAAAATATGATAGATCATGTAATAAAACAA
AATAAACATCAATATTTAATTACTTATGAAGATAAATACTATAGGTGGTTT
TTCTACACATTTCAATAATTATTTAATAGAAAATAATTATATTACAAAAC
ATAACTTATATGTTTACATAATATTTATTTATCTAATGAGCCAATTGAACAT
GCATCTTTTAAGGATCAACAAGAAGTCGTCAAATGGATAAATGTAGTCT
TGTC AATAGAATTAAAAATTATCTTAAAAATAATCCTACATGATGTAAGA
TAAATATATATTTCTAAAATTATTTTTTTTTTATACTTTAATGTGTACAA
TAAAATATATATCTAAATATATTTTATTTGTACGCTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTAATTGTTATTTTTGTATAT

1b. ábra 2. része

atgaagaaatatatttatatatatTTTTTcttcatcacaataactattaatgatttagta
M K K Y I Y I Y F F F I T I T I N D L V
ataaataatacatcaaaatgtgTTTccattgaaagaagaaaaataacgcataataaat
I N N T S K C V S I E R R K N N A Y I N
tatggatataggatataatggaccagataataaaataacaaagagtagaagatgtaaaaga
Y G I G Y N G P D N K I T K S R R C K R
ataaagttatgcaaaaaggatttaatatagatattgggtgcaataaagaaccaattaatgta
I K L C K K D L I D I G A I K K P I N V
gcaatTTTTggaagtactggtagtataggtacgaatgctTTaataataaagggagtgt
A I F G S T G S I G T N A L N I I R E C
aataaaattgaaaatgTTTTaatgttaaagcattgtatgtgaataagagtgatgaatgaa
N K I E N V F N V K A L Y V N K S V N E
ttatatgaacaagctagagaatTTTTaccagaatatttTgtgtatacatgataaaagtgta
L Y E Q A R E F L P E Y L C I H D K S V
tatgaagaattaaaagaactggtaaaaaatataaaagattataaacctataatattgtgt
Y E E L K E L V K N I K D Y K P I I L C
gggtgatgaagggatgaaagaatatgtagtagtaatagtatagataaaatagttattggT
G D E G M K E I C S S N S I D K I V I G
attgattctTTTcaaggattatattctactatgtatgcaattatgaataataaaatagtt
I D S F Q G L Y S T M Y A I M N N K I V
gcgtagctaataaagaatccattgtctctgctggtttctTTTTaagaaattattaat
A L A N K E S I V S A G F F L K K L L N
attcataaaaatgcaaagataataacctgttgattcagaacatagtgctatatttcaatgt
I H K N A K I I P V D S E H S A I F Q C
ttagataataataaggtattaaaaacaaaatgTTTacaagacaattTTTTctaaaattaac
L D N N K V L K T K C L Q D N F S K I N
aatataaataaaaatattTTTTatgttcatctggaggTccatttcaaaatttaactatggac
N I N K I F L C S S G G P F Q N L T M D
gaattaaaaaatgtaacatcagaaaatgctTTTaaagcatcctaataatggaaaatgggtaag
E L K N V T S E N A L K H P K W K M G K
aaaataactatagattctgcaactatgatgaataaaggTTtagaggTtatagaaacccat
K I T I D S A T M M N K G L E V I E T H
TTTTtatttgatgtagattataatgatatagaagTtatagTacataaagaatgcattata
F L F D V D Y N D I E V I V H K E C I I
cattcttTgtTgaatttatagacaaatcagtaataagtcaaatgtattatccagatagT
H S C V E F I D K S V I S Q M Y Y P D M
caaataccatattatattctTTaactatggcctgatagaataaaaacaaattTaaaacct
Q I P I L Y S L T W P D R I K T N L K P
ttagattTggctcaggTTTcaactctTacattTcataaacctTctTTagaacattTcccg
L D L A Q V S T L T F H K P S L E H F P
tgtattaaattagcttatcaagcaggtataaaaggaaactTTTTatccaactgtactaat
C I K L A Y Q A G I K G N F Y P T V L N
gcgTcaaatgaaatagctaacaacttattTTTTgaataataaaaattaaatattTgatatt
A S N E I A N N L F L N N K I K Y F D I
tcctctataatattcgcaagTtctTgaatctTTcaattctcaaaaggTtTcggaatagT
S S I I S Q V L E S F N S Q K V S E N S
gaagattTaatgaagcaaatTctacaaatacattctTgggccaagataaagctaccgat
E D L M K Q I L Q I H S W A K D K A T D
atatacaacaacataattctTcatag
I Y N K H N S S -

2a. ábra

tcgatcttctcattttcgtttcagcttttatcaatgatttttaattatgtgtttttaag
M I F N Y V F F K
aactttgtaccagttgttctatacattctccttataatataattaactttaatggcatg
N F V P V V L Y I L L I I Y I N L N G M
aataataaaaatcaaataaaaacagaaaaatttatataaagaaattgaataggttgca
N N K N Q I K T E K I Y I K K L N R L S
aggaaaaattcgttatgtagttctaaaaataaaaatagcatgcttgttcगतataggaat
R K N S L C S S K N K I A C L F D I G N
gatgataatagaatacgcacatatggctataatgtgaatgttaaaaatgatgataat
D D N R N T T Y G Y N V N V K N D D I N
tccttactaaaaataattatagtaataaattgtacatggataagaggaaaaatattaat
S L L K N N Y S N K L Y M D K R K N I N
aatgtaattagtagtaataaaaatctgggtccatttcaaataatttgtagtagaaatcaa
N V I S T N K I S G S I S N I C S R N Q
aaagaaaatgaacaaaaaagaataaacaagatgtttaactcaatgtcacacttataat
K E N E Q K R N K Q R C L T Q C H T Y N
atgtcacatgaacaggacaaactagctaataataataggaataataaaaagaatttt
M S H E Q D K L A N D N N R N N K K N F
aatttattattataaattatttttaatttgaaacgaatgaaaaattctcttctaataaa
N L L F I N Y F N L K R M K N S L L N K
gacaatttcttttactgtaaagaaaaaaattgtcatttctgcataaggcctataaaaaa
D N F F Y C K E K K L S F L H K A Y K K
aaaaattgcacttttcaaattatagtttaaaaagaaaatctaactcgtgattcacataaa
K N C T F Q N Y S L K R K S N R D S H K
ttgttttctggagaatttgacgattatacaataataatgcttttatatgaatccgaaaaa
L F S G E F D D Y T N N N A L Y E S E K
aaagaatacattacactaaataataataaaaaataataataaaaaataatgataat
K E Y I T L N N N N K N N N N K N N D N
aaaaataatgataataatgattataataataataatagttgtaataatttaggagagaga
K N N D N N D Y N N N N S C N N L G E R
tccaatcattatgataattatggtggagataataataatccatgtaataataatgac
S N H Y D N Y G G D N N N P C N N N N D
aaatatgatataggaatatttcaaacagattaatacctttattaatattgatgaatat
K Y D I G K Y F K Q I N T F I N I D E Y
aaaactatatatggtgatgaaatatataaagaatataatgaactatatgtagaagaat
K T I Y G D E I Y K E I Y E L Y V E R N
attcctgaatattatgaacgaaaatatttttcagaagatattaaaaagagtgtcctattt
I P E Y Y E R K Y F S E D I K K S V L F
gatatagataaatataatgatgtcgaatttgaaaaagctataaaagaagaatttataaat
D I D K Y N D V E F E K A I K E E F I N
aatggagtttatattaataatagataatacatattataaaaaagaaaatatttttaata
N G V Y I N N I D N T Y Y K K E N I L I
atgaaaaagatattacattatttcccattattaaaattaattaataatccatcagattta
M K K I L H Y F P L L K L I N N P S D L
aaaaagttaaaaaacaatatttacctttatttagcacatgaattaaaaatatttttattt
K K L K K Q Y L P L L A H E L K I F L F
tttattgtaaatataacaggaggtcatttttctctgttttaagctcttttagaaattcaa
F I V N I T G G H F S S V L S S L E I Q

2b. ábra 1. része

ttattattattgtatatttttaataccaacatgataatggttatatatgatataggacat
 L L L L Y I F N Q P Y D N V I Y D I G H
 caagcatatgtacataagataattgaccggaagaaaactattatttctatcattaagaaat
 Q A Y V H K I L T G R K L L F L S L R N
 aaaaaaggtatttagtggattcctaaatatttttgaaagtatttatgataaatttggggct
 K K G I S G F L N I F E S I Y D K F G A
 ggtcacagttccacttcattaagtgctatacaaggatattatgaagccgagtggaagtg
 G H S S T S L S A I Q G Y Y E A E W Q V
 aagaataaagaaaaatattgaaatggagatatagaataagtgataacgcaaatgtcagc
 K N K E K Y G N G D I E I S D N A N V T
 aataatgaaaggatatttcaaaaaggaatacacaatgataataattaacaataatatt
 N N E R I F Q K G I H N D N N I N N N I
 aataataataattatatcaatccttcagatgtggttaggaagagaaaatacgaatgtacca
 N N N N Y I N P S D V V G R E N T N V P
 aatgtacgaaatgataaccataacgtggataaagtacacattgctattataggagatggt
 N V R N D N H N V D K V H I A I I G D G
 ggtttaacaggtggaatggcattagaagcgttaaattatatttcattcttgaattctaa
 G L T G G M A L E A L N Y I S F L N S K
 attttaattatttataatgataacggacaagtttctttaccaacaatgccgtaagtata
 I L I I Y N D N G Q V S L P T N A V S I
 tcaggtaatagacctataggctctatatcagatcatttacattattttgtttctaatata
 S G N R P I G S I S D H L H Y F V S N I
 gaagcaaatgctggtgataataaattatcgaaaaatgcaaaagagaataacatttttgaa
 E A N A G D N K L S K N A K E N N I F E
 aatttgattatgattatattggtggtggaatggaataatacagaagagctctttaa
 N L N Y D Y I G V V N G N N T E E L F K
 gtattaataataataaaagaaaataaattaaaaagagctactggtcttcatgtacgtaca
 V L N N I K E N K L K R A T V L H V R T
 aaaaaatcgaatgattttataaattcaaagagtcacaataagtatattgcactctataaag
 K K S N D F I N S K S P I S I L H S I K
 aaaaatgagattttcccttcgataccactatattaatggaaatattcataaggagaac
 K N E I F P F D T T I L N G N I H K E N
 aagatagaagaagagaaaaatgtgtcttcatctacaaagtatgatgtaataataagaat
 K I E E E K N V S S S T K Y D V N N K N
 aataaaaaataatgataatagtgaattataaaatattgaagatatgttttcaaaagagagc
 N K N N D N S E I I K Y E D M F S K E T
 ttcacagatatatacaaatgaaatgttaaaatatttaagaaagatagaaatataata
 F T D I Y T N E M L K Y L K K D R N I I
 ttcctatctcccgtatggttaggagatcaggattggttaaaattagtgagcgttatcca
 F L S P A M L G G S G L V K I S E R Y P
 aataatgtatatgatgtaggtatagcagaacaacattctgtaactttcgcagcagctatg
 N N V Y D V G I A E Q H S V T F A A A M
 gcaatgaataagaaattaaaaatacaattatgtatatattcgacctttttacaagagca
 A M N K K L K I Q L C I Y S T F L Q R A
 tatgatcaaatatacatgatcttaatttacaataataccttttaagggttataattgga
 Y D Q I I H D L N L Q N I P L K V I I G

2b. ábra 2. része

agaagtggattagtaggagaggatggggcaacacatcaaggtatatatgattttatcttat
 R S G L V G E D G A T H Q G I Y D L S Y
 cttgggacacttaacaatgcatatataatatctccaagtaatcaagttgatttgaaaaga
 L G T L N N A Y I I S P S N Q V D L K R
 gctcttaggtttgcttatttagataaggaccattctgtgtatatacgtatacccagaatg
 A L R F A Y L D K D H S V Y I R I P R M
 aacatattaagtgataagtacatgaaaggatatttgaacattcatatgaaaaatgagagc
 N I L S D K Y M K G Y L N I H M K N E S
 aaaaatcgcgatgtaaacgtggatataaacgatgatgtagataaatatagtgagaatat
 K N I D V N V D I N D D V D K Y S E E Y
 atggacgatgataattttataaaatcgtttattggaaaatctagaattattaaaatggat
 M D D D N F I K S F I G K S R I I K M D
 aatgaaaataataatacaaatgaacattattcaagcagaggagatacacagacaaaaaaa
 N E N N N T N E H Y S S R G D T Q T K K
 aaaaaagtttgatctttaacatgggtagtagcttttttaatgtaattaatgctataaaa
 K K V C I F N M G S M L F N V I N A I K
 gaaattgaaaagaacaatatatttcacataattattctttttcaattggtgatagata
 E I E K E Q Y I S H N Y S F S I V D M I
 tttttaaatcctttagataaaaatatgatagatcatgtaataaaacaaaataaacatcaa
 F L N P L D K N M I D H V I K Q N K H Q
 tatttaacttatgaagataataactataggtggtttttctacacatttcaataattat
 Y L I T Y E D N T I G G F S T H F N N Y
 ttaatagaaaataattatattacaaaacataacttatatgttcataatatttattatct
 L I E N N Y I T K H N L Y V H N I Y L S
 aatgagccaattgaacatgcatcttttaaggatcaacaagaagtcgtcaaaatggataaa
 N E P I E H A S F K D Q Q E V V K M D K
 tgtagtcttgtcaatagaattaaataatcttaaaaataatcctacatgatgtaagata
 C S L V N R I K N Y L K N N P T -

2b. ábra 3. része

MKKYIYIYFFFITITINDLVINNTSKCVSIERRKNNAYINY
 GIGYNGPDNKITKSRRCKRIKLCCKDLIDIGAIKKPINVAIFGSTGSIGTNALNIIRECN
 KIENFVNVKALYVNKSVNELYEQAREFLPEYLCIHDKSVYEELKELVKNIKDYKPIILCG
 DEGMKEICSSNSIDKIVIGIDSFOGLYSTMYAIMNKNIVALANKESIVSAGFFLKKLLNI
 HKNAKIIPVDSEHSAIFQCLDNNKVLKTKLQDNFSKINNINKIFLCSSGGPFQNLTMDE
 LKNVTSENALKHPKWKMGKKITIDSATMMNKGLEVIETHFLFDVDYNDIEVIVHKECI IH
 SCVEFIDKSVISQMYYPDMQIPILYSLTWPDRIKTNLPLDLAQVSTLTFHKPSLEHFPC
 IKLAYQAGIKGNFYPTVLNASNEIANNLFLNNKIKYFDISSIISQVLESFNSQKVSENSE
 DLMKQILQIHSWAKDKATDIYNKHNS

3a. ábra



MIFNYVFFK
 NFVPPVLYILLI IYINLNGMNNKNQIKTEKIYIKKLNRLSRKNSLCSSKNKIACLFDIGN
 DDNRNTTYGYNVVKNDDINSLKNNYSNKLYMDKRKNINNVISTNKISGSISNICSRNQ
 KENEQQRNKQRCLTQCHTYNMSHEQDKLANDNRRNKNKNFNLLFINYFNLKRMKNSLLNK
 DNFFYCKEKKLSFLHKAYKKKNCTFQNYSLKRKSNRDSHKLFSGEFDDYTNNNALYESEK
 KEYITLNNNNKNNNNKNNNDNKNNDNNDYNNNNSCNNLGERSNHYDNYGGDNNNPCNNND
 KYDIGKYFKQINTFINIDEYKTIYGDEIYKEIYELYVERNIPYERKYFSEDIKKSVLFF
 DIDKYNDVEFEKAIKEEFINNGVYINNIDNTYYKKENILIMKKILHYFPLLKLNPNPSDL
 KKLKKQYLPPLLAHELKIFLFFIVNITGGHFSSVLSLEIQLLLLLYIFNQPYDNVIYDIGH
 QAYVHKILTGRKLLFLSLRNKKGISGFLNIFESIYDKFGAGHSSTLSAISAIQGYEAEWQV
 KNKEYGNGDIEISDNANVTNNERIFQKGIHNDNNINNNINNNNYINPSDVVGRENTNVP
 NVRNDNHNVDKVHIAIIGDGGLTGGMALEALNYISFLNSKILIIYNDNGQVSLPTNAVSI
 SGNRPIGSI SDHLHYFVSNIEANAGDNKLSKNAKENNIFENLNYDYIGVVNGNNTTEELFK
 VLNNIKENKLRATVLHVRTKKSNDFINSKSPISILHSIKKNEIFPFDTTILNGNIHKEN
 KIEEEKNVSSSTKYDVNNKNNKNNNDNSEI IKYEDMFSKETFTDIYTNEMLKYLKKDRNI I
 FLSPAMLGGSGLVKISERYPNNVYDVGIAEQHSVTFAAAMAMNKKLKIQLCIYSTFLQRA
 YDQIIHDLNLQNIPLKVIIGRSGLVGEDGATHQGIYDLSYLGTLNNAYIISPSNQVDLKR
 ALRFAYLDKDHVYIRIPRMNILSDKYMKGYLNIHMKNESKNIDVNVDINDDVDKYSEY
 MDDDNFIKSFIGKSRI IKMDNENNTNEHYSSRGDTQTKKKKVCIFNMGSMLEFNVAIAIK
 EIEKEQYISHNYSFSIVDMI FLNPLDKNMIDHVIKQNKHQYLITYEDNTIGGFSTHFNNY
 LIENNYITKHNLVHNIYLSNEPIEHASFKDQEQEVVKMDKCSLVNRIKNYLKNNPT

3b. ábra

1 GATGAAATAT ATAAAGAAAT ATATGAACTA TATGTAGAAA GAAATATTCC
 51 TGAATATTAT GAACGAAAAT ATTTTTCAGA AGATATTAAA AAGAGTGTCC
 101 TATTTGATAT AGATAAATAT AATGATGTCG AATTTGAAAA AGCTATAAAA
 151 GAAGAATTTA TAAATAATGG AGTTTATATT AATAATATAG ATAATACATA
 201 TTATAAAAAA GAAAATATTT TAATAATGAA AAAGATATTA CATTATTTCC
 251 CATTATTAAA ATTAATTAAT AATCCATCAG ATTTAAAAAA GTTAAAAAAA
 301 CAATATTTAC CTTTATTAGC ACATGAATTA AAAATATTTT TATTTTTTAT
 351 TGTAATATA ACAGGAGGTC ATTTTCCCTC TGTTTTAAGC TCTTTAGAAA
 401 TTCAATTATT ATTATTGTAT ATTTTAAATC AACCATATGA TAATGTTATA
 451 TATGATATAG GACATCAAGC ATATGTACAT AAGATATTGA CCGGAAGAAA
 501 ACTATTATTT CTATCATTAA GAAATAAAAA AGGTATTAGT GGATTCCTAA
 551 ATATTTTTGA AAGTATTTAT GATAAATTTG GGGCTGGTCA CAGTTCCACT
 601 TCATTAAGTG CTATACAAGG ATATTATGAA GCCGAGTGGC AAGTGAAGAA
 651 TAAAGAAAAA TATGGAAATG GAGATATAGA AATAAGTGAT AACGCAAATG
 701 TCACGAATAA TGPAAGGATA TTTCAAAAAG GAATACACAA TGATAATAAT
 751 ATTAACAATA ATATTAATAA TAATAATTAT ATCAATCCTT CAGATGTGGT
 801 AGGAAGAGAA AATACGAATG TACCAAATGT ACGAAATGAT AACCATAAACG
 851 TGGATAAAGT ACACATTGCT ATTATAGGAG ATGGTGGTTT AACAGGTGGA
 901 ATGGCATTAG AAGCGTTAAA TTATATTTCA TTCTTGAATT CTAAAATTTT
 951 AATTATTTAT AATGATAACG GACAAGTTTC TTTACCAACA AATGCCGTAA
 1001 GTATATCAGG TAATAGACCT ATAGGTTCTA TATCAGATCA TTTACATTAT
 1051 TTTGTTTCTA ATATAGAAGC AAATGCTGGT GATAATAAAT TATCGAAAAA
 1101 TGCAAAAGAG AATAACATTT TTGAAAATTT GAATTATGAT TATATTGGTG
 1151 TTGTGAATGG TAATAATACA GAAGAGCTCT TTAAAGTATT AAATAATATA
 1201 AAAGAAAATA AATTA AAAAG AGCTACTGTT CTTCATGTAC GTACAAAAAA
 1251 ATCGAATGAT TTTATAAATT CAAAGAGTCC AATAAGTATA TTGCACTCTA
 1301 TAAAGAAAAA TGAGATTTTC CCGTTCGATA CCACTATATT AAATGGAAT
 1351 ATTCATAAGG AGAACAAGAT AGAAGAAGAG AAAAATGTGT CTTCATCTAC
 1401 AAAGTATGAT GTAAATAATA AGAATAATAA AAATAATGAT AATAGTGAAA
 1451 TTATAAAATA TGAAATATG TTTTCAAAAAG AGACGTTTAC AGATATATAT

4a. ábra 1. része

1501 ACAAATGAAA TGTAAAATA TTAAAGAAA GATAGAAATA TAATATTCCT
 1551 ATCTCCCGCT ATGTTAGGAG GATCAGGATT GGTTAAAATT AGTGAGCGTT
 1601 ATCCAAATAA TGTATATGAT GTAGGTATAG CAGAACAACA TTCTGTAAC
 1651 TTCGCAGCAG CTATGGCAAT GAATAAGAAA TTAAAATAC AATTATGTAT
 1701 ATATTCGACC TTTTACAAA GAGCATATGA TCAAATTATA CATGATCTTA
 1751 ATTTACAAAA TATACCTTTA AAGGTTATAA TTGGAAGAAG TGGATTAGTA
 1801 GGAGAGGATG GGGCAACACA TCAAGGTATA TATGATTTAT CTTATCTTGG
 1851 GACACTTAAC AATGCATATA TAATATCTCC AAGTAATCAA GTTGATTTGA
 1901 AAAGAGCTCT TAGGTTTGCT TATTTAGATA AGGACCATTC TGTGTATATA
 1951 CGTATACCCA GAATGAACAT ATTAAGTGAT AAGTACATGA AAGGATATTT
 2001 GAACATTCAT ATGAAAAATG AGAGCAAAAA TATCGATGTA AACGTGGATA
 2051 TAAACGATGA TGTAGATAAA TATAGTGAAG AATATATGGA CGATGATAAT
 2101 TTTATAAAAT CGTTTATTGG AAAATCTAGA ATTATTAATA TGGATAATGA
 2151 AAATAATAAT ACAAATGAAC ATTATTCAAG CAGAGGAGAT ACACAGACAA
 2201 AAAAAAAAAA AGTTTGTATC TTTAACATGG GTAGTATGCT TTTTAATGTA
 2251 ATTAATGCTA TAAAAGAAAT TGAAAAAGAA CAATATATTT CACATAATTA
 2301 TTCTTTTCA ATTGTTGATA TGATATTTTT AAATCCTTTA GATAAAAATA
 2351 TGATA

4a. ábra 2. része



10 30 50
 GATGAAATATATAAAGAAATATATGAACCTATATGTAGAAAGAAATATTCCTGAATATTAT
 D E I Y K E I Y E L Y V E R N I P E Y Y

70 90 110
 GAACGAAAATATTTTTCAGAAGATATTAAGAGAGTGCCTATTGATATAGATAAATAT
 E R K Y F S E D I K K S V L F D I D K Y

130 150 170
 AATGATGTCGAATTTGAAAAAGCTATAAAAAGAAGATTTATAAATAATGGAGTTTATATT
 N D V E F E K A I K E E F I N N G V Y I

190 210 230
 AATAATATAGATAATACATATTATAAAAAAGAAAATTTTTAATAATGAAAAAGATATTA
 N N I D N T Y Y K K E N I L I M K K I L

250 270 290
 CATTATTTCCCATTTATAAATTAATAATCCATCAGATTTAAAAAGTTAAAAAA
 H Y F P L L K L I N N P S D L K K L K K

310 330 350
 CAATATTTACCTTTATTAGCACATGAATTAATAATTTTTATTTTTTATTGTAATATA
 Q Y L P L L A H E L K I F L F F I V N I

370 390 410
 ACAGGAGTCAATTTTCCTCTGTTTTAAGCTCTTTAGAAATTCATTATTATTATTGTAT
 T G G H F S S V L S S L E I Q L L L L Y

430 450 470
 ATTTTAATCAACCATATGATAATGTTATATATGATATAGGACATCAAGCATATGTACAT
 I F N Q P Y D N V I Y D I G H Q A Y V H

490 510 530
 AAGATATTGACCGGAAGAAAATTTCTATCATTAAAGAAATAAAAAAGGTATTAGT
 K I L T G R K L L F L S L R N K K G I S

550 570 590
 GGATTCCTAAATATTTTTGAAAGTATTTATGATAAATTTGGGGCTGGTCACAGTTCCACT
 G F L N I F E S I Y D K F G A G H S S T

610 630 650
 TCATTAAGTGCTATACAAGGATATTATGAAGCCGAGTGGCAAGTGAAGAATAAAGAAAA
 S L S A I Q G Y Y E A E W Q V K N K E K

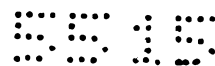
670 690 710
 TATGAAATGGAGATATAGAAATAAGTGATAACGCAAATGTCACGAATAATGAAAGGATA
 Y G N G D I E I S D N A N V T N N E R I

730 750 770
 TTTCAAAAAGGAATACACAATGATAAATAATTAACAATAATTAATAATAATAATTAT
 F Q K G I H N D N N I N N N I N N N Y

790 810 830
 ATCAATCCTTCAGATGTGGTAGGAAGAGAAAATACGAATGTACCAAATGTACGAAATGAT
 I N P S D V V G R E N T N V P N V R N D

850 870 890
 AACCATAACGTGGATAAAGTACACATTGCTATTATAGGAGATGGTGGTTTAAACAGGTGGA
 N H N V D K V H I A I I G D G G L T G G

4b. ábra 1. része



910 930 950
 ATGGCATTAGAAGCGTTAAATTATATTTTCATTCTTGAATTCTAAAATTTTAATTATTTAT
 M A L E A L N Y I S F L N S K I L I I Y

970 990 1010
 AATGATAACGGACAAGTTTCTTTACCAACAAATGCCGTAAGTATATCAGGTAATAGACCT
 N D N G Q V S L P T N A V S I S G N R P

1030 1050 1070
 ATAGTTCTATATCAGATCATTACATTATTTTGTTCCTAATATAGAAGCAAATGCTGGT
 I G S I S D H L H Y F V S N I E A N A G

1090 1110 1130
 GATAATAAATTATCGAAAATGCAAAGAGAATAACATTTTTGAAAATTTGAATTATGAT
 D N K L S K N A K E N N I F E N L N Y D

1150 1170 1190
 TATATTGGTGTGTGAATGGTAATAATACAGAAGAGCTCTTTAAAGTATTAATAATATA
 Y I G V V N G N N T E E L F K V L N N I

1210 1230 1250
 AAAGAAAATAAATTAAGAGCTACTGTTCTTCATGTACGTACAAAAAATCGAATGAT
 K E N K L K R A T V L H V R T K K S N D

1270 1290 1310
 TTTATAAATTCAAAGAGTCCAATAAGTATATTGCACTCTATAAAGAAAAATGAGATTTTC
 F I N S K S P I S I L H S I K K N E I F

1330 1350 1370
 CCGTTCGATACCACTATATTAATGGAATATTCATAAGGAGAACAAGATAGAAGAAGAG
 P F D T T I L N G N I H K E N K I E E E

1390 1410 1430
 AAAAATGTGTCTTCATCTACAAAGTATGATGTAATAATAAGAATAATAAAAAATATGAT
 K N V S S S T K Y D V N N K N N K N N D

1450 1470 1490
 AATAGTGAAATTATAAAATATGAAGATATGTTTTCAAAGAGACGTTACAGATATATAT
 N S E I I K Y E D M F S K E T F T D I Y

1510 1530 1550
 ACAAATGAAATGTTAAAATATTTAAAGAAAGATAGAAATATAATATTCCTATCTCCCGCT
 T N E M L K Y L K K D R N I I F L S P A

1570 1590 1610
 ATGTTAGGAGGATCAGGATTGGTTAAAATTAGTGAGCGTTATCCAAATAATGTATATGAT
 M L G G S G L V K I S E R Y P N N V Y D

1630 1650 1670
 GTAGGTATAGCAGAACAACATTCTGTAACCTTCGCAGCAGCTATGGCAATGAATAAGAAA
 V G I A E Q H S V T F A A A M A M N K K

1690 1710 1730
 TTAAAAATACAATTATGTATATATTCGACCTTTTTACAAAGAGCATATGATCAAATTATA
 L K I Q L C I Y S T F L Q R A Y D Q I I

1750 1770 1790
 CATGATCTTAATTTACAAAATATACCTTTAAAGGTTATAATTGGAAGAAGTGGATTAGTA
 H D L N L Q N I P L K V I I G R S G L V

1810 1830 1850
 GGAGAGGATGGGGCAACACATCAAGGTATATATGATTTATCTTATCTTGGGACACTTAAC
 G E D G A T H Q G I Y D L S Y L G T L N

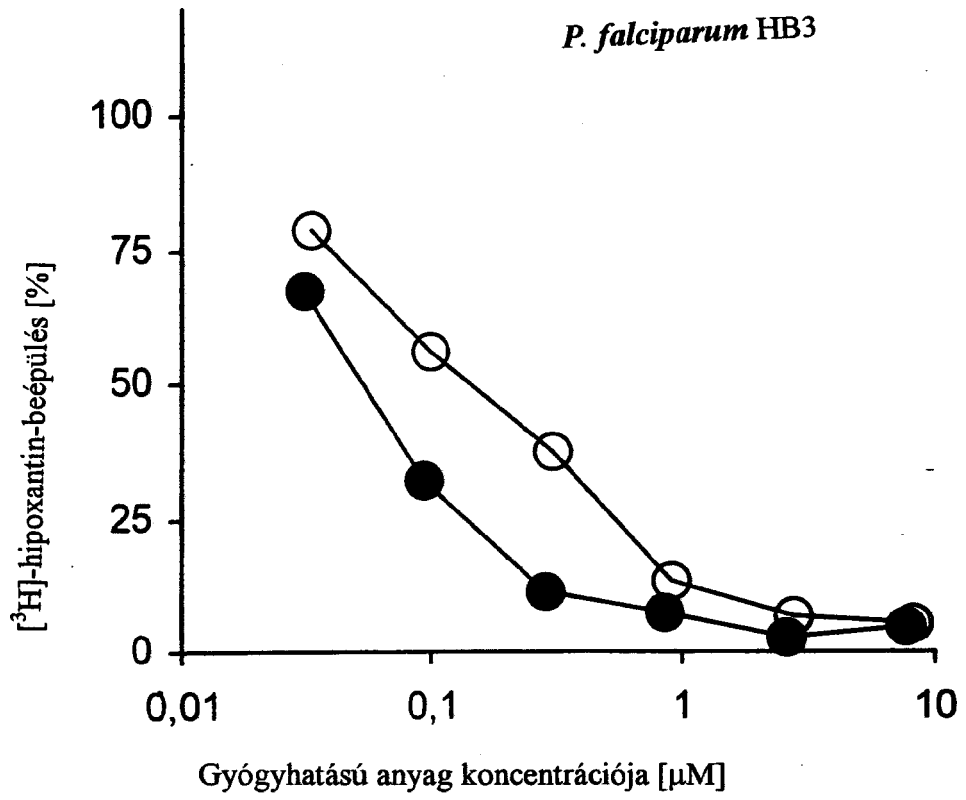
4b. ábra 2. része

1 DEIYKEIYEL YVERNIPEYY ERKYFSEDIK KSVLFDIDKY NDVEFEKAIAK
 51 EEFINNGVYI NNIDNTYYKK ENILIMKKIL HYFPLLKLIN NPSDLKKLKK
 101 QYLPLLAHEL KIFLFFIVNI TGGHFSSVLS SLEIQLLLLLY IFNQPYDNVI
 151 YDIGHQAYVH KILTGRKLLF LSLRNKKGIS GFLNIFESYIY DKFGAGHSST
 201 SLSAIQGYE AEWQVKNKEK YGNGDIEISD NANVTNNERI FQKGIHNDNN
 251 INNNINNNNY INPSDVVGRE NTNVPNVRND NHNVDKVHIA IIGDGGLTGG
 301 MALEALNYIS FLNSKILIIY NDNGQVSLPT NAVSISGNRP IGSISDHLHY
 351 FVSNIEANAG DNKLSKNAKE NNIFENLNYD YIGVVNGNNT EELFKVLNNI
 401 KENKLKRATV LHVRTKKSND FINSKSPISI LHSIKKNEIF PFDTTILNGN
 451 IHKENKIEEE KNVSSSTKYD VNNKNNKNND NSEIIKYEDM FSKETFTDIY
 501 TNEMLKYLKK DRNIIIFLSPA MLGGSGLVKI SERYPNNVYD VGIAEQHSVT
 551 FAAAMAMNKK LKIQLCIYST FLQRAYDQII HDLNLQNIPL KVIIGRSGLV
 601 GEDGATHQGI YDLSYLGTLN NAYIISPSNQ VDLKRALRFA YLDKDHSVYI
 651 RIPRMNILSD KYMKGYLNIH MKNESKNIDV NVDINDDVVK YSEEYMDDDN
 701 FIKSFIGKSR IIKMDNENNN TNEHYSSRGD TQTKKKKVC I FNMGSMLFNV
 751 INAIKEIEKE QYISHNYSFS IVDMIFLNPL DKNMI

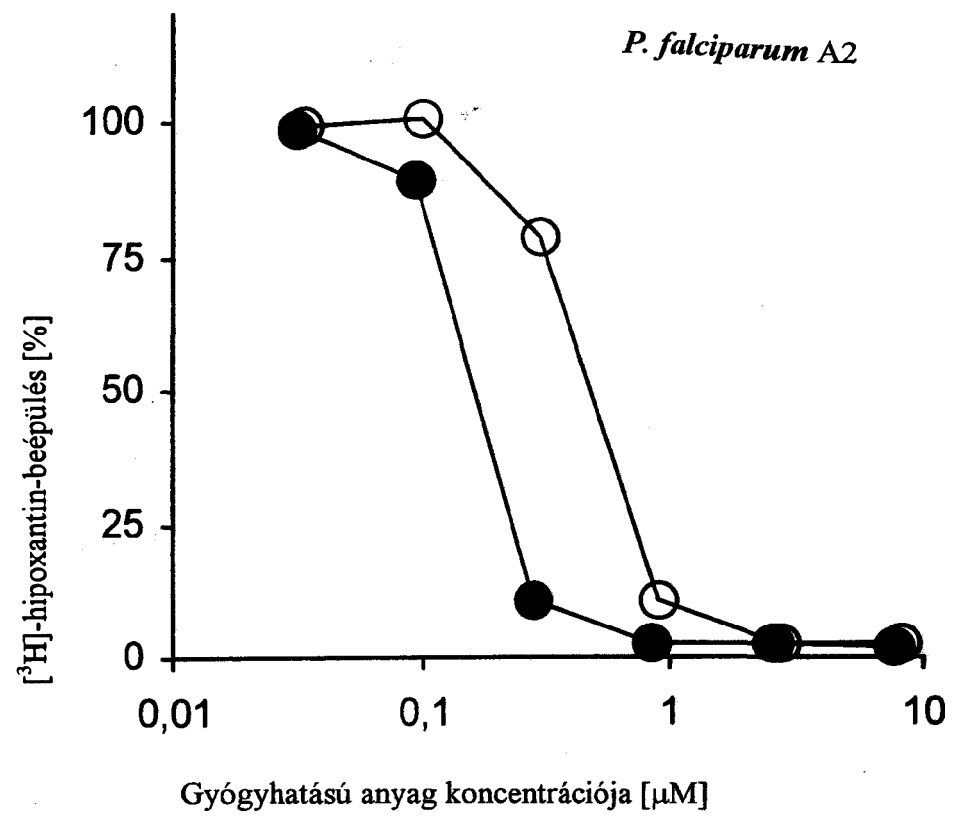
4c. ábra

Dózis [mg/kg]	Parazitémia [%]	
	Formyl	Acetyl
300	0.0	0.0
30	0.0	0.0
10	0.0	0.0
5	0.06 ± 0.17	0.0
2	11.7 ± 16.5	0.86 ± 0.44
Kontroll	65.9 ± 19.1	65.9 ± 19.1

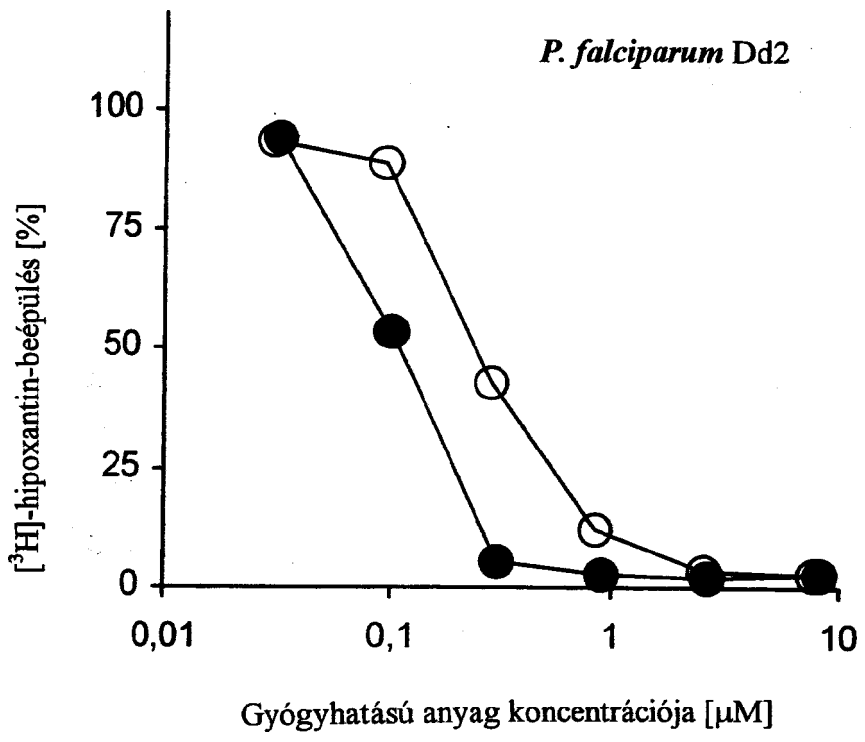
5. ábra



6a. ábra

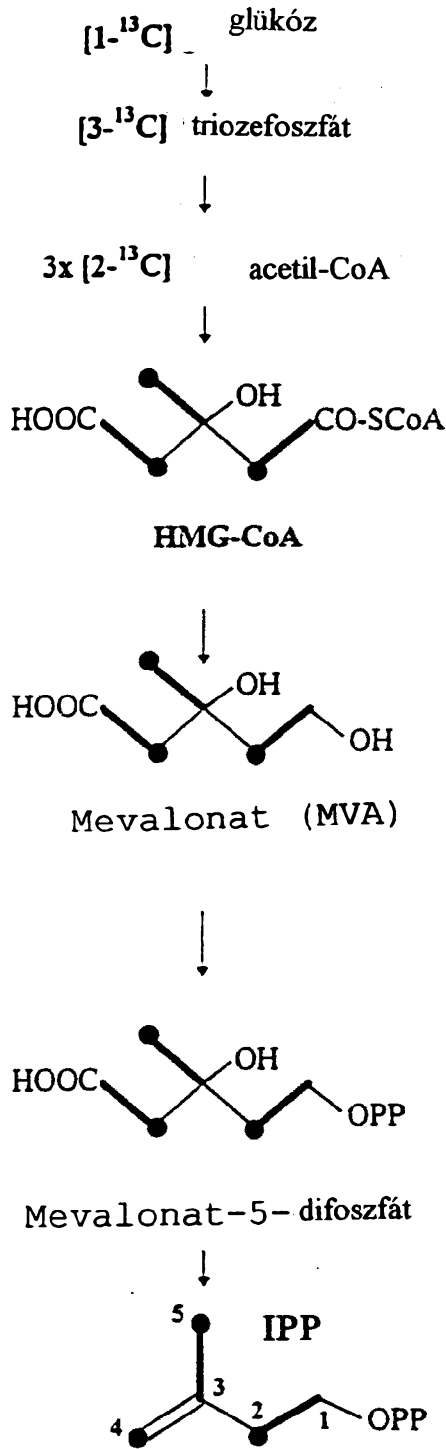


6b. ábra



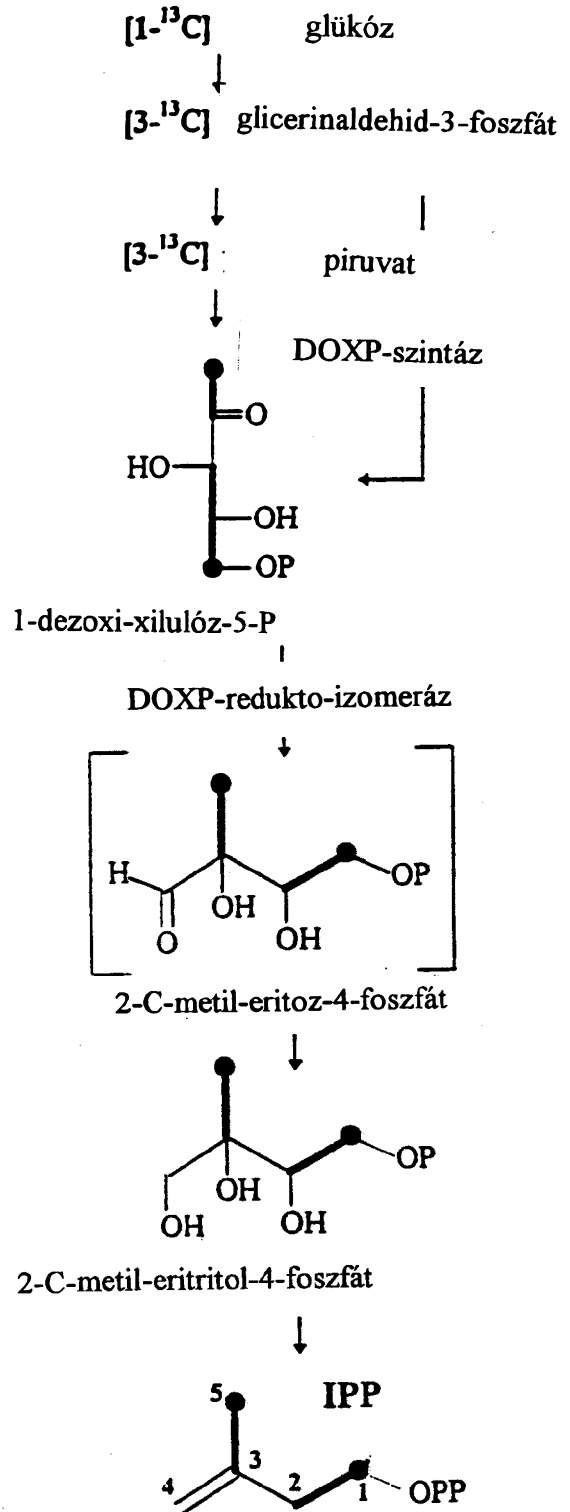
6c. ábra

Klasszikus acetát/mevalonat-
anyagcsereút



magasabb rendű növények (citoplazmák)
állatok, gombák; eubaktériumok

Alternatív DOX-P
anyagcsereút



magasabb rendű növények (plasztidok)
zöld algák, számos eubaktérium

7. ábra