

9601498

62.465/SZE / 96
74276

62.465/SZE

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A

K I V O N A T

Apoptosist szabályozó proteinek, a proteinek kódoló DNS és alkalmazásuk

A találmány tárgyát képezik az új *Bcl-1* homológokat, azaz a *Cdn-1*, *Cdn-2* és *Cdn-3* jelű fehérjéket és származékaikat kódoló, lényegében megtisztított DNS-ek, valamint az *Cdn-1* és *Cdn-2* nukleotidokat expresszáló rekombináns sejtek és transzgenikus állatok. A találmány tárgyát képezik továbbá a lényegében megtisztított *Cdn-1* és *Cdn-2* fehérjék és készítményeik, a nukleotidokat és fehérjéket alkalmazó diagnosztikai és terápiás módszerek, valamint azok a szűrővizsgálati módszerek, amelyekkel a *Cdn-1* és *Cdn-2* expresszióját, fehérje aktivitását és kölcsönhatását serkentő gyógyászati hatóanyagokat, valamint az ezeket befolyásoló gyógyászati hatóanyagokat lehet keresni. A *Cdn*-ekkel kölcsönhatásba lépő fehérjék szűrővizsgálati módszerei is a találmány tárgyát képezik.

Oldalain: 64-66
képek: 3
Jelle: 1
96.08.26.
M

9601448

•••••••••• / 96

62.465/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

Apoptosist szabályozó proteinek, a proteinek kódoló DNS és alkalmazásuk

A találmány tárgyát apoptózis-moduláló aktivitással rendelkező új fehérjék, a fehérjéket kódoló rekombináns DNS, a fehérjéket tartalmazó készítmények valamint ezek alkalmazási módszerei képezik.

Az apoptózis egy normál fiziológiai folyamat, amely az egyes sejtek pusztulásához vezet. A programozott sejthalálnak ez a folyamata számos különböző normális és patogén biológiai eseményben szerepet játszik, és számos, egymással kapcsolatban nem levő dologgal serkenthető. Az apoptózis biológiai szabályozásában változások lépnek fel az öregedés során, és ezek a felelősek az öregedéshez kapcsolódó számos állapotért és betegségért. Az apoptózis legújabb tanulmányozása során kiderült, hogy a sejthalálhoz vezető általános metabolikus út számos különböző szignállal beindítható, beleértve hormonokat, szérum növekedési faktorok megvonását, kemoterápiás ágenseket, ionizáló sugárzásokat és a humán immunhiányos megbetegedést okozó vírussal (HIV) való fertőződést [Wyllie: Nature 284, 555-556 (1980); Kanter és mtsai: Biochem. Biophys. Rec. Commun. 118, 392-399 (1984); Duke és Cohen: Lymphokine Res.: 5, 289-299 (1986); Tomei és mtsai: Biochem. Biophys. Rec. Commun. 155, 324-331 (1988); Kruman és mtsai: J.Cell. Physiol. 148, 267-273 (1991); Ameisen és Capron: Immunology Today 12, 102 (1991); Sheppard és Ascher J. AIDS 5, 143 (1992)]. Tehát az apoptózis biológiai szabályozását befolyásoló ágensek terápiás alkalmazhatósággal rendelkeznek számos különböző állapotban.

Az apoptotikus sejtpusztulást a sejtek összezsugorodása, a kromatin kondenzációja, a citoplazma hólyagosodása, a fokozott membrán-permeabilitás és az



internukleoszomális DNS hasítás jellemzi [Kerr és mtsai: FASEB J. 6, 2450 (1992); Cohen és Duke: Ann. Rev. Immunol. 10, 267 (1992)]. A hólyagok, azaz a kis, membránnal burkolt gömbök, amelyek az apoptotikus sejtek felszínére csipődnek ki, tovább folytathatják szuperoxid gyökök termelését, amelyek elroncsolják a környező sejtszövetet, és szerepet játszhatnak a gyulladási folyamatokban.

A *Bcl-2*-t a t(14:18) közös kromoszómális transzlokációs pontban fedezték fel follikuláris limfómákban, amelyek a *bcl-2* aberráns túlexpresszióját eredményezik [Tsujiimoto és mtsai: Science 226, 1097-1099 (1984); Cleary és mtsai: Cell 47, 19-28 (1986)]. A *bcl-2* normális funkciója az, hogy megakadályozza az apoptózist; azt gondolják, hogy a *bcl-2* B-sejtekben való szabályozatlan expressziója vezethet növekvő számú szaporodó B-sejtekhez, amelyek kritikus faktorok lehetnek a limfóma kifejlődésében [McDonnell és Korsmeyer: Nature 349, 254-256 (1991); Edgington: Bio/Tech. 11 787-792 (1993)]. A *Bcl-2* emellett képes a γ -sugarakkal besugárzott sejtpusztulás blokkolására is [Sentman és mtsai: Cell 67, 879-888 (1991); Strasser: Cell 67 889-899 (1991)]. Az ma már ismert, hogy a *bcl-2* gátolja az apoptotikus sejtpusztulás legtöbb fajtáját, és azt gondolják róla, hogy úgy működik, hogy szabályozza az antioxidáns bioszintézis utat a szabad gyök képződésének helyén, és a Ca^{++} fluxust az endoplazmatikus retikulumon keresztül [Lan és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 91, 6569-6573 (1984); Hockenbery és mtsai: Cell 75, 241-251 (1993)].

Jóllehet az apoptózis egy normális sejtfolyamat, beindítható patológiás állapotokkal és számos különböző sérüléssel is. Az apoptózis szerepet játszik számos különböző állapotban, beleértve, de anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a kardiovaszkuláris betegséget, a rák regressziót, az immunszabályozást, a virális betegségeket, az anémiát, a neurológiai rendellenességeket, a gasztrointesztinális rendellenességeket, ideértve, de anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a

hasmenést és a dizentériát; a cukorbetegséget, a kopaszodást, az átültetett szervek kilökődését, a prosztata hipertrófiát, az elhízást, a szem rendellenességeit, a stresszt és az öregedést.

A *Bcl-2* egy olyan fehérjecsaldba tartozik, amelynek néhány tagját már klónozták és szekvenálták [Williams és Smith: Cell 74, 777-779 (1993)]. Minden idézett művet, publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A találmány tárgyát képezik az új *Bcl-1* homológokat, azaz a *Cdn-1*, *Cdn-2* és *Cdn-3* jelű fehérjéket és származékaikat kódoló, lényegében megtisztított DNS-ek, valamint a *Cdn-1* és *Cdn-2* nukleotidokat expresszáló rekombináns sejtek és transzgenikus állatok. A találmány tárgyát képezik továbbá a lényegében megtisztított *Cdn-1* és *Cdn-2* fehérjék és készítményeik. A találmány tárgyát képezik továbbá a nukleotidokat és fehérjéket alkalmazó diagnosztikai és terápiás módszerek. A találmány tárgyát képezik továbbá azok a szűrővizsgálati módszerek, amelyekkel a *Cdn-1* és *Cdn-2* expresszióját, fehérje aktivitását és kölcsönhatását serkentő gyógyászati hatóanyagokat, valamint az ezeket befolyásoló gyógyászati hatóanyagokat lehet keresni. A *Cdn*-ekkel kölcsönhatásba lépő fehérjék szűrővizsgálati módszerei is a találmány tárgyát képezik.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábrán a *Bcl-2* család PCR primerei láthatók, amelyeket a *Cdn-1* próbák izolálására használtunk.

A 2. ábrán láthatók azok a *Cdn-1* klónok, amelyeket az 1. példában leírtak alapján állítottunk elő.

A 3. ábrán látható a *Cdn-1* cDNS nukleotid szekvenciája, valamint a *Cdn-1* fehérje aminosav szekvenciája.

A 4. ábrán látható több szövet Northern blot elemzése mind *Bcl-2*-re mind *Cdn-1*-re specifikus próbákkal.



Az 5. ábrán látható a *Cdn-2* gén szekvenciája valamint a határoló szekvenciák, valamint a *Cdn-2* fehérje megfelelő, számított aminosav szekvenciája.

A 6. ábrán a *Cdn-1*, *Cdn-2* és a *Bcl-2* család ismert tagjai N-terminális aminosav szekvenciájának összehasonlítása.

A 7. ábrán látható a *Cdn-3* gén nukleotid szekvenciája, valamint a *Cdn-3* fehérje számított aminosav szekvenciája.

A 8. ábrán láthatók a *Cdn-1* és néhány származéka anti-apoptotikus hatásai WI-L2 transzformánsok szérum-megvonással indukált apoptózisában 0,1% FBS-ben.

A 9. ábrán (a WIL-2 transzformánsok válasza az anti-Fas-indukált apoptózisra (50 ng/ml anti-Fas)) láthatók a *Cdn-1* és néhány származéka anti-apoptotikus hatásai a WI-L2 sejtek FAS-szal indukált apoptózisában.

A 10. ábrán látható a *Cdn-1* és a *Cdn-2* által okozott apoptózis befolyásolása FL5.12 sejtekben.

A 11. ábrán láthatók a *Cdn-1* származék-fehérjéi, a $\Delta 1$, $\Delta 2$ és $\Delta 3$. Az N-terminális csoportokat nyilak jelzik. A származék többi része ugyanaz, mint a teljes hosszúságú *Cdn-1*-é.

A jelen találmány tárgyát képezik az új *Bcl-1* homológokat, azaz a *Cdn-1*-et és *Cdn-2*-t kódoló, lényegében megtisztított nukleotid szekvenciák, valamint az ezek által kódolt fehérjék, valamint a *Cdn-1* és *Cdn-2* nukleotidokat tartalmazó készítmények, valamint a fehérjék és azok alkalmazásának módszerei. Felhívjuk a figyelmet, hogy a 08/160,067 sorozatszámú Amerikai Egyesült Államok-beli függő szabadalmi bejelentésben a *Cdn-1*-et cdi-1-nek említik, és a 08/320,157 sorozatszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentésben a *Cdn*-t cdn-nek említik, a *Cdn*-t pedig CDN-nek; jóllehet a nevek megváltoztak, a nukleotid- és aminosav szekvenciák azonosak maradtak. A találmány tárgyát képezik továbbá a klónozott *Cdn-1*

vagy *Cdn-2* géneket expresszáló rekombináns sejtek és transzgenikus állatok. A *Cdn-1* által kódolt nukleotid- és a számított aminosav szekvencia a 3. ábrán látható; ugyanezek a *Cdn-2*-re vonatkozóan az 5. ábrán láthatók. Kiderült, hogy a *Cdn* gének által kódolt fehérjék képesek befolyásolni az apoptózist. Egy Epstein-Barr vírussal (EBV) transzformált limfoblasztoid sejtvonalban a *Cdn-1*-ről kimutatták, hogy csökkenti a Fas által közvetített apoptózist. Egy egér B őssejt vonalban, az FL5.12-ben a *Cdn-2* és a *Cdn-1* egy származékának expressziója csökkenti az IL-3 által indukált apoptózist, míg a *Cdn-1* expressziója enyhén fokozza az apoptózist. Így tehát, a sejt-típustól, az expresszált *Cdn* származékától vagy típusától és az apoptózis indukálási módszerétől függően, az apoptózis nagyon specifikus módon befolyásolható, a *Cdn*-ek expressziójának és a *Cdn*-ek koncentrációjának szabályozásával.

A továbbiakban a “*Cdn*-ek” vagy “*Cdn*” szakkifejezés az alábbiakban ismertetett nukleinsav molekulákra (nukleotidokra) vonatkozik (*Cdn-1*, *Cdn-2*, *Cdn-3* és származékaik), míg a “*Cdn*-ek” vagy “*Cdn*” az általuk kódolt fehérjékre (*Cdn-1*, *Cdn-2*, *Cdn-3*) vonatkozik. A jelen találmány tárgyát a *Cdn-1* és *Cdn-2* nukleotid szekvenciák képezik. A nukleotidok közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a *Cdn-1* cDNS, a genom-eredetű DNS és a szintetikus vagy félszintetikus nukleotidok, azaz például a DNS, és RNS, mind a kódoló száluk, mind a kódoló régióval komplementer száluk. A nukleotidok komplementerek lehetnek az mRNS-sel, legalább a cDNS egy fragmense erejéig, valamint lehetnek egyéb nukleotidok, amelyek kötődhetnek a cDNS-t kódoló DNS-hez vagy mRNS-hez. Ezek közé a komplementer nukleotidok közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a tripla hélixeket és antiszensz nukleotidokat formáló nukleotidok. A komplementer nukleotidokat expresszálhatjuk endogén formában, az alábbiakban ismertetett vektorok egyikével, vagy beadhatjuk exogén módon, az oligonukleotid terápia szakterületen ismert módszerekkel [Reed és mtsai: *Cancer Res.* 50, 6565-6570 (1990)]. A

Cdn-1 cDNS nukleotid szekvenciája látható a 4. ábrán, a restriktív endonukleáz hasítási helyekkel együtt. Amint azt az alábbi példákban ismertetjük, a *Cdn-1* mRNS-t számos különböző emberi szervben és szövetben sikerült kimutatni Northern blot elemzéssel. Ezek közé a szervek közé tartozik a máj, a vázizom, a tüdő, a vese és a hasnyálmirigy, amint azt a 3. ábrán bemutatjuk.

Hasonlóképpen, a *Cdn-2* cDNS, genomális DNS és szintetikus vagy félszintetikus nukleotidok a jelen találmány további megvalósítási módját képezik. A *Cdn-2* gén nukleotid szekvenciáját, a *Cdn-2* fehérje számított aminosav szekvenciájával együtt, valamint a restriktív endonukleáz hasítási helyek feltüntetésével az 5. ábrán adjuk meg.

Az alábbiakban ismertetett példák azt mutatják, hogy a *Cdn-1* a humán 6. kromoszómán található, a *Cdn-2* pedig a humán 20. kromoszómán található. A családnak van még egy tagja, a *Cdn-3*, amely a humán 11. kromoszómán található. Az *in situ* végzett fluoreszcencia hibridizálás (FISH) azt mutatja, hogy a *Cdn-1* homológ helye a 6p21-23 pontban található. Lehetséges, hogy a *Cdn-1* és a *Cdn-2* pszeudogének. Jóllehet ezek nem expresszálhatók endogén módon, képesek arra, hogy egy rekombináns vektorral expresszálódjanak, amely vektor tartalmazza a megfelelő promotor szekvenciákat. Így mind a *Cdn-2* mind a *Cdn-3* nukleotid szekvenciák a jelen találmány tárgyát képezik, csakúgy, mint rekombináns konstrukcióik és az általuk kódolt fehérjék.

A gének és fehérjék származékai közé tartozik a fehérje bármely része, vagy az azt a fehérjét kódoló nukleotid szekvencia, amely megtartja az apoptózist befolyásoló aktivitását. A 11. ábrán a *Cdn-1* három ilyen származéka látható, amelyekről kimutatták, hogy megtartják az apoptózist befolyásoló aktivitásukat. Ezek a származékok, azaz a *Cdn1-Δ1*, a *Cdn1-Δ2* és a *Cdn1-Δ3*, valamint az ezek által kódolt fehérjék is a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak.



A találmány tárgyát képezik a *Cdn* cDNS szekvenciák módosításai, azaz például a deléciók, helyettesítések és addíciók, különösen a genomiális DNS nem-kódoló régióiban. Ezek a szekvenciák jól használhatók a klónozás megkönnyítésére és a gén-expresszió módosítására.

A találmány tárgyát képezik tovább a különböző helyettesített nukleotidok. A helyettesítéseket elvégezhetjük a kódoló régió belül, amelyek vagy nem változtatják meg a kódolt aminosav csoportot, vagy a helyettesített aminosav csoport konzervatív helyettesítését eredményezik. Azok a nukleotid helyettesítések, amelyek nem változtatják meg a kódolt aminosav csoportot, jól használhatók a génextpresszió optimalizálására különböző rendszerekben. A megfelelő helyettesítések ismertek a szakterületen jártas szakember számára, és általában úgy végzik el, hogy tükrözzék az előnyös kodonhasználatot az adott expressziós rendszerben.

A találmány tárgyát képezik a *Cdn*-ek funkcionálisan ekvivalens variánsai és származékai, amelyek nem változtatják meg lényegesen a *Cdn*-ek tulajdonságait. A DNS szekvenciának az olyan változásai nem változtatják meg lényegesen a tulajdonságokat, mint például az olyan csere, amely nem változtatja meg a kódolt aminosavat, vagy az aminosav csoportok konzervatív helyettesítését eredményező változások, egy vagy néhány aminosav delécióját eredményező változások, valamint az aminosav csoportok helyettesítése aminosav analógokkal.

Az egymás konzervatív helyettesítésére képes aminosav csoportok az alábbiak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat: glicin/alanin; valin/izoleucin/leucin; aszparagin/glutamin; aszparaginsav/glutaminsav; szerin/ treonin; lizin/arginin és fenilalanin/tirozin. Minden olyan konzervatív aminosav helyettesítés, amely nem változtatja meg lényegesen a *Cdn*-ek tulajdonságait, a jelen találmány oltalmi körébe tartozik.



A találmány tárgyát képezik tovább a *Cdn*-ek mutánsai, amelyek, ha expresszáljuk őket, akkor kölcsönhatásba lépnek az endogén módon expresszált *Cdn*-ekkel. Az ilyen mutánsokat bármely, a szakterületen ismert módszerrel előállíthatjuk, és megvizsgálhatjuk azt a képességüket, hogy tudják-e befolyásolni a természetes *Cdn*-ek aktivitását.

A jelen találmány megvalósításában jól használható nukleinsav manipulációs technikák ismertek a szakterületen, és számos szakkönyvben összefoglalták őket [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, szerk.: Ausubel és mtsai, Greene Publishing és Wiley-Interscience: New York (1987)], valamint ezek periodikus időszerűsítései.

A találmány tárgyát képezi továbbá a számos különböző DNS vektor, amelyek beléjük klónozott *Cdn* nukleotid szekvenciákat tartalmaznak. Megfelelő vektor lehet bármely, a szakterületen ismert vektor, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a bakteriális, emlős, élesztő és rovar expressziós rendszereket. A specifikus vektorok ismertek a szakterületen, és az alábbiakban nem kell részletesen ismertetni őket.

A vektorok tartalmazhatnak indukálható promotereket a *Cdn* nukleotid szekvenciák expresszáálására. Azok az indukálható vektorok, amelyek nem engedik a gén jelentős konstitutív expresszióját, hanem ehelyett csak bizonyos körülmények között teszik lehetővé az expressziót. Ezek a promoterek indukálhatók számos különböző módon, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a vektort tartalmazó sejt érintkeztetését egy ligandummal, fémmionnal, más vegyülettel vagy hőmérséklet-változással. A promoterek lehetnek sejtspecifikusak is, azaz, csak egy bizonyos sejt-típusban indukálhatók, és gyakran csak egy bizonyos periódusban indukálhatók. A promoter lehet továbbá sejtciklus specifikus is, azaz olyan, hogy csak a sejtciklusnak

csak egy bizonyos pontján indukálható. A promoter lehet mind sejt-specifikus mind sejtciklus-specifikus. Bármelyik, a szakterületen ismert indukálható vagy nem indukálható promoter alkalmas a jelen találmányban való alkalmazás céljára. A használt promoter előnyösen indukálható.

A találmány tárgyát képezik továbbá a vektorokkal transzfektált különböző expressziós rendszerek. A megfelelő expressziós rendszerek közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a bakteriális, emlős, élesztő és rovar expressziós rendszer.

A találmány tárgyát képezi a *Cdn* nukleotid szekvenciákkal végzett *ex vivo* transzfekció, melynek során az állatokból, beleértve az embereket is, eltávolított sejteket transzfektáljuk a *Cdn* nukleotidokat tartalmazó vektorokkal, majd visszajuttatjuk az állatokba. Az alkalmas transzfektált sejtek közé tartoznak az egyedi sejtek vagy az egy komplett szövetben levő sejtek. Emellett az *ex vivo* transzfekció jelentheti az olyan sejtek transzfekcióját, amelyek nem abból az állatból vagy emberből származnak, amelybe végül bejuttatjuk. Az ilyen graftok lehetnek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, allograftok, xenograftok és megzati szövettranszplantációk. Emellett az *in vivo* transzfekció, azaz például a megfelelő vektorok pulmonáris beadása is alkalmazható.

Lényegében bármely sejt vagy sejtípus kezelhető ezzel a módszerrel. A megfelelő sejtek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a kardiomiociták és a limfociták. Például a limfocitákat eltávolítjuk, a rekombináns DNS-sel transzfektáljuk, majd visszajuttatjuk egy HIV-pozitív betegbe, ezzel fokozhatjuk a visszajuttatott T-sejtek fél-élettartamát.

Példaként megemlíthetjük, hogy az előzőkben ismertetett módszerrel kezelve HIV-fertőzött betegeket, a betegből eltávolítjuk a fehér vérsejteket, majd kiválogatjuk közülük a CD⁺ sejteket. A CD⁺ sejteket azután a *Cdn* nukleotidokat tartalmazó vek-



torral transzfektáljuk, és visszajuttatjuk a betegbe. Egy másik módszer szerint a válogatatlan limfocitákat transzfektálhatjuk egy rekombináns vektorral, amelynek legalább egy *Cdn* nukleotidja egy sejtspecifikus promoter szabályozása alatt áll, így csak a CD4⁺ sejtek expresszálják a nukleotidokat. Ebben az esetben az ideális promoter a CD4 promoter; azonban bármelyik CD4⁺ T-sejt specifikus promoter használható.

Továbbá, a találmány tárgyát képezik a vektorokkal *in vivo* transzfektált sejtek. Az *in vivo* transzfekeció megfelelő módszereit a szakirodalomban leírták, és ide tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, azok, amelyeket Zhu és munkatársai közöltek [Zhu és mtsai: Science 261, 209-211 (1993)]. Az *in vivo* transzfekeció különösen hasznos lehet profilaktikus kezelésnek atheroszklerózisban szenvedő betegeknél. A *Cdn* szintjének szabályozása megakadályozhatja az apoptózis-hoz kötődő reperfüziós károsodást, amely a cerebrális és miokardiális infarktusból származik. Ezekben a betegeknél, akik a sztrók és szívroham magas kockázatának vannak kitéve, az arteriális obsztrukcióhoz kapcsolódó apoptózis és reperfüziós károsodás megelőzhető, vagy legalábbis enyhíthető.

Az infarktusból az arteriális vagy vénás vér hirtelen elégtelensége okozza, ami embólia vagy vérrög következménye, vagy egy olyan nyomásé, amely makroszkópikus nekrotikus területet hoz létre; leginkább a szív, az agy, a lép, a vese, a bél, a tüdő és a herék érintettek. Az apoptózis az infarktust körülvevő szövetekben fordul elő, akkor, amikor a vér újból beáramlik a területre; tehát a *Cdn* szintek szabályozásával, amit egy biológiai módosító anyaggal indukált változással érhetünk el az endogén termelésben, *in vivo* transzfekecióval, vagy antiszensz terápiával, hatásosan csökkenthetjük a szívroham vagy a sztrók által okozott károsodást.

A *Cdn* nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns DNS vektorokat hordozó transzgenikus állatok is a találmány oltalmi körébe tartoznak. A transzgenikus



állatok előállításai módszerei ismertek a szakterületen, ezért itt nem szükséges részletesen ismertetni. A transzgenikus állatok előállítására használt módszerek leírása megtalálható például a WO 93/04169 számú PCT publikációban. Az ilyen állatok a rekombináns *Cdn*-eket előnyösen egy sejtspecifikus, és még előnyösebben, sejtciklus-specifikus promotor vezérlésével expresszálják.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát a *Cdn*-ek expressziója kimutatására használt diagnosztikai módszerek képezik, mind fehérje szinten, mind a mRNS szintjén. Bármelyik ellenanyag, amelyik specifikusan felismeri a *Cdn*-eket, használható a *Cdn* diagnosztikában. A *Cdn*-ek abnormális szintje valószínűleg olyan betegek szöveteiben található meg, akik a nem megfelelő apoptózishoz kötődő betegségben szenvednek; a diagnosztikai módszerek tehát alkalmasak az ilyen apoptózis defektusokhoz kapcsolódó biológiai állapotok kimutatására és követésére. A kimutatási módszerek jól használhatók még a *Cdn*-hez kötődő terápiák sikerességének kezelésére.

A vagy rekombináns DNS-ről vagy biológiai forrásokból, azaz például szövetekből expresszált *Cdn*-ek tisztítását vagy izolálását bármely, a szakirodalomban ismertett módszerrel elvégezhetjük. A fehérjetisztítási módszerek ismertek a szakirodalomban. Általában azokat tekintjük lényegében megtisztított fehérjéknek, amelyek mentesek más, szennyező sejtes anyagoktól, különösen fehérjéktől. A tisztított *Cdn*-ek előnyösen nyolcvan százalékosnál tisztábbak, de még előnyösebb, ha kilencvenöt százaléknál tisztábbak. Az alábbiakban ismertetett klinikai alkalmazáshoz a *Cdn*-ek legalább kilencvenkilenc százalékos tisztaságúak, mentesek a pirogénektől és egyéb szennyezőanyagoktól.

A fehérjetisztítás alkalmas módszerei ismertek a szakirodalomban, és ide tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az affinitáskromatográfia, az immunaffinitáskromatográfia, a méretkizárásos kromatográfia, a HPLC és az FPLC.

Bármely tisztítási eljárás, amely nem okozza a fehérje jelentős bomlását, alkalmas a jelen találmány szerinti alkalmazásra.

A találmány tárgyát képezik továbbá a lényegében tisztított Cdn-ek, amelyeknek az aminosav szekvenciája a 3. és 5. ábrán látható. A találmány oltalmi körébe tartoznak a Cdn-eknek azok a funkcionálisan ekvivalens variánsai, amelyeknek nem változtak meg lényegesen a tulajdonságaik, valamint azok a variánsok, amelyek általában megtartják ugyanazt az aminosav szekvenciát, de fokozott vagy csökkent biológiai aktivitással rendelkeznek. Például az aminosav csoport konzervatív helyettesítése, egy vagy több aminosav deléciója vagy addíciója, valamint aminosav csoportok aminosav analógokkal való cseréje is a jelen találmány oltalmi körébe tartozik. Bármely konzervatív aminosav helyettesítés, amely nem változtatja meg lényegesen a Cdn-ek tulajdonságait, a jelen találmány oltalmi körébe tartozik.

A megfelelő ellenanyagokat a Cdn-ek mint antigének használatával, vagy előnyösebben olyan peptidek használatával hozzuk létre, amelyek tartalmazzák azokat a Cdn régiókat, amelyeknek nincs lényeges homológiájuk a *Bcl-2* család többi géntermékével. A fehérjék ellenanyagokkal való kimutatásának módszerei és az ellenanyagok előállítási módszerei fehérjék vagy szintetikus peptidek alkalmazásával ismert a szakterületen, ezért nem ismertetjük részletesebben.

A Cdn fehérje expresszióját követhetjük a *Cdn* mRNS szintjének mérésével. Bármelyik, a specifikus mRNS kimutatására alkalmas módszer használható ebben a módszerben. Egyszerűen elvégezhető a polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával. A PCR-hez választott primerek előnyösen megfelelnek a *Cdn* gének azon régióinak, amelyek nem tartalmaznak lényeges homológiát a *Bcl* géncsalád egyéb tagjaival. Egy másik módszer szerint Northern blotok használhatók a *Cdn* mRNS kimutatására, a Cdn-ekre specifikus próbák felhasználásával. A PCR és a Northern



blot használatának módszerei ismertek a szakterületen, ezért nem ismertetjük részletesen.

A *Cdn*-ekkel való kezelés módszerei közé tartozik még a *Cdn*-ek celluláris expressziójának befolyásolása, a mRNS vagy a fehérje szintjének fokozásával vagy csökkentésével. A *Cdn* celluláris expressziójának befolyásolására szolgáló módszerek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az alábbiak: az endogén expresszió fokozása biológiai módosító anyagokkal; a sejtek *Cdn* nukleotidokat tartalmazó vektorokkal való transzfekciója, úgy, hogy vagy a *Cdn* gén expresszálódik fölös mennyiségben, vagy egy antiszensz nukleotid expresszálódik; valamint olyan mutáns *Cdn*-ek expressziója, amelyek zavarják az endogén *Cdn* kölcsönhatását más fehérjékkel, azaz például a *Bcl-2* család más tagjaival. A celluláris transzfekciót az előzőekben tárgyaltuk, amellet a szakirodalomban is ismert. A *Cdn* endogén szintje modulációjának megfelelő jelzései, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a malignanciák és a szívspecifikus expresszió. A szívspecifikus expresszió különösen alkalmas az alábbi indikációkban való alkalmazásra, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat: szivbetegségekre érzékeny betegek és kardiotoxikus terápiák előrehaladása, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat a kemoterápiákat, azaz például az adriamicin kezelést, hogy kardioprotekciót tudjunk létrehozni.

A *Cdn*-ek endogén expressziójának módosítását úgy érhetjük el, hogy a sejteket biológiai módosítók hatásának tesszük ki, amelyek közvetlenül vagy közvetve megváltoztatják a *Cdn*-ek szintjét, vagy a *Cdn*-ek expressziójának befolyásolásával, vagy a *Cdn* mRNS lebomlásának befolyásolásával. A megfelelő biológiai módosítók közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a molekulák és egyéb sejtek. A megfelelő molekulák közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a gyógyszerek, citokinek, kis molekulák, hormonok,

az interleukinek kombinációi, a lektinek és egyéb serkentő ágensek, azaz például a PMS, LPS, bispecifikus ellenanyagok és egyéb ágensek, amelyek befolyásolják a celluláris funkciókat vagy a fehérje-expressziót. Egy alkalmas biológiai módosító anyag előnyösen a γ -IFN, amely fokozza a *Cdn* expressziójának szintjét HT-29 sejtekben. Emellett, a biológiai módosítók közé tartoznak a *Cdn* nukleotidok, amelyek módosítják az endogén *Cdn* expresszióját, és a mutáns *Cdn*-ek, amelyek zavarják az endogén *Cdn*-ek aktivitását. A sejteket fiziológiásan hatékony koncentrációjú ilyen biológiai módosítók hatásának tesszük ki, és a *Cdn*-ek expresszióját a biológiai módosítók ki nem tett kontrollokhoz viszonyítva határozzuk meg. Azokat a biológiai módosítókat, amelyek megváltoztatják a *Cdn*-ek a kontrollhoz viszonyított expresszióját, azokat választjuk ki a további vizsgálatokhoz.

A *Cdn*-ek endogén szintjének csökkentésére szolgáló módszerek, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az antiszensz nukleotid terápia, valamint az értelmes vagy antiszensz konstrukció eljuttatási módszerei és az expresszió csökkentése biológiai módosítókkal. Az antiszensz terápia ismert a szakterületen, alkalmazása nyilvánvaló lesz a szakterületen jártas szakember számára.

A terápiásan hatékony biológiai módosítók szűrővizsgálatát vagy úgy végezzük, hogy a sejteket biológiai módosítókkal hozzuk érintkezésbe, amelyek közvetlenül vagy közvetve befolyásolhatják a *Cdn*-ek szintjét, vagy az expresszió megváltoztatásával, vagy a *Cdn* mRNS vagy a *Cdn*-ek fél-életidejének megváltoztatásával. A biológiai módosítók zavarhatják a *Cdn*-1 kölcsönhatását mind a *Bcl-2* család tagjaival, mind egyéb géntermékekkel, azaz például proteázokkal. A megfelelő biológiai módosítók közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a molekulák és egyéb sejtek. A megfelelő molekulák közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a gyógyszerek, citokinek, kis molekulák, hormonok, az interleukinek kombinációi, a lektinek és egyéb

serkentő ágensek, azaz például a PMS, LPS, bispecifikus ellenanyagok, *Cdn* nukleotidok, *Cdn* mutánsok és egyéb ágensek, amelyek befolyásolják a celluláris funkciókat vagy a fehérje-expressziót. A sejteket olyan körülmények között szaporítjuk, amelyekről ismert, hogy legalább egy *Cdn* (előnyösen a *Cdn-1*) expresszióját elősegítik, az ilyen biológiai módosítószerrel fiziológiásan hatékony koncentrációban érintkeztetve, majd a *Cdn*-ek expresszióját a kontrollhoz (amely nem érintkezett a biológiai módosítószerrel) viszonyítva mérjük. Azokat a biológiai módosítószereket választjuk ki a további vizsgálatokhoz, amelyek a kontrollhoz viszonyítva befolyásolják a *Cdn*-ek expresszióját. A sejtek életképességét is mérjük, hogy biztosítsuk, a megváltozott *Cdn* expresszió nem a sejtpusztulás következménye.

A biológiai módosítószereknek a *Cdn* expresszióját módosító (fokozás vagy csökkentés) képességének meghatározásakor mérhetjük az endogén expresszió szintjét, vagy mérhetjük a rekombináns fúziós fehérjék szintjét, egy *Cdn*-specifikus promoter szabályozásával. A fúziós fehérjéket a riporter gének kódolják.

A riporter gének ismertek a szakterületen, és ide tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a kloramfenikol-acetiltranszferáz (CAT) és a β -galaktozidáz. A *Cdn-1* és a *Cdn-2* expresszióját követhetjük az előzőekben ismertetett módon, vagy a fehérje vagy a mRNS szintek alapján. A riporter gének expresszióját követhetjük enzimátikus vizsgálatokkal vagy ellenanyag-alapú vizsgálatokkal, mint például ELISA-val és RIA-val, amelyek szintén ismertek a szakterületen. Potenciális gyógyászati ágens lehet bármelyik, a szakterületen ismert terápiás ágens vagy vegyszer, vagy bármelyik természetes forrásból, mint például gomba fermentlevekből és növényi kivonatokból származó jellemzetlen vegyület. Előnyösen azok a megfelelő gyógyászati ágensek, amelyeknek lényegében nincs citotoxicitásuk és karcinogenitásuk.

A *Cdn*-ek endogén szintjének megfelelő indikációi azok, amelyekben a *Cdn*-ek által közvetített apoptózis szerepet játszik. Ezek közé tartoznak, anélkül, hogy



ezekre korlátoznánk magunkat, a különböző malignanciák és egyéb rendellenességek, amelyek ellenőrizetlen sejtnövekedést, mint például ekcémát okoznak, vagy a normális programozott sejtpusztulás deficienciái, mint például a malignanciák, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat a B-sejt limfómákat.

A találmány tárgyát képezik továbbá a terápiás módszerek és készítmények, amelyek magukban foglalják a betegek kezelését olyan biológiai módosítószerrel, amelyek befolyásolják a *Cdn*-ek expresszióját. A hatékony koncentrációkat és dózistartományokat tapasztalati úton lehet meghatározni. Ezek a meghatározási módszerek ismertek a szakterületen jártas szakember számára, és függenek például a beteg korától, testsúlyától és nemétől, valamint a betegség típusától és súlyosságától. Egy másik módszer szerint a betegeket közvetlenül kezelhetjük vagy a természetes vagy a rekombináns *Cdn*-ekkel. A *Cdn*-eknek lényegében tisztáknak kell lenniük és pirogénmentesnek. Az is ajánlott, hogy a rekombináns *Cdn*-eket emlős sejtvonalban állítsuk elő, hogy ezzel biztosítsuk a megfelelő glikozilezettséget. A *Cdn*-ek előállíthatók rovar sejtvonalban is.

A gyógyászati készítményekhez a lényegében tiszta *Cdn* vagy az annak expresszióját vagy aktivitását módosító biológiai módosítószer vagy oligonukleotid, gyógyászatilag hatásos mennyiségét fiziológiásan elfogadható pufferben szuszpendáljuk, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat a sóoldatot és foszfáttal pufferelt sóoldatot (PBS), majd beadjuk a betegnek. A beadás előnyösen intravénás. A beadás egyéb módszerei közé tartozik, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a szubkután, intraperitoneális, gasztrointesztinális beadás, valamint az egy specifikus szervbe való közvetlen beadás, azaz például az intrakardiális, hogy a szívinfarktushoz kapcsolódó sejtpusztulást kezeljük ezzel.

A megfelelő pufferek és a beadás módszerei ismertek a szakirodalomban. A *Cdn* vagy annak biológiai módosítószere hatékony koncentrációját tapasztalati úton



kell meghatározni, ez függ a betegség típusától és súlyosságától, a betegség előrehaladtától és a beteg egészségi állapotától. Ezeknek a meghatározása a szakterületen jártas szakember számára ismert.

A *Bcl-2*-ről ismert, hogy egy antioxidáns bioszintézis útban működik [Veis és mtsai: *Cell* 75, 229-240 (1993)]. Ennek következtében a *Cdn*-eket alkalmazó terápia alkalmas olyan állapotokban való felhasználásra, amelyekben a szuperoxid szerepet játszik. A *Cdn* expresszió modulátorainak beadása a *Cdn*-ek fokozott extracelluláris koncentrációját eredményezi, amelyről ismert, hogy módszert szolgáltat a szuperoxid felhalmozódás közvetlen gátlására, amely az apoptózis kapcsán létrejövő hólyagokban lép fel. A terápiás módszer lényege tehát, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a szuperoxid által közvetített sejsérülés gátlása.

A *Cdn*-ek, vagy biológiai módosítószerük terápia alkalmazásának alkalmas indikációi ennek következtében azok, amelyekben a szabad gyökök által közvetített sejtpusztulás játszik szerepet, ide tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, azok az állapotok, amelyekről korábban azt gondolták, hogy a szuperoxid-diszmutázzal kezelhetők. Ezek közé az állapotok közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a HIV fertőzés, az autoimmun betegségek, a kardiomiopátiák, a neuronális rendellenességek, a hepatitisz és egyéb májbetegségek, az oszteoporózis és a sokk-szindrómák, beleértve, anélkül, hogy erre korlátoznánk magunkat, a szeptikémiát.

A klónozott *Cdn* DNS hibridizálása az agy különböző régióiból származó hírvívő mRNS-ekhez azt mutatja, hogy mindegyik vizsgált régióban a *Cdn-1* magas szinten expresszálódik (8. ábra). Ennélfogva a neurológiai rendellenességek egy újabb terület, amelyen a *Cdn*-ek gyógyászati alkalmazása várható.

A találmány tárgyát képezik továbbá a vizsgálati módszerek *Cdn*-ek és az azok között a fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálatára, amelyek specifikusan

kötődnek a Cdn-ekhez. A vizsgálatban a tisztított Cdn-eket sejtlyázátumokkal hozzuk érintkezésbe, amelyek tartalmazzák a Cdn-ekhez esetleg kötődő fehérjét, olyan körülmények között, amelyek között a fehérje képes kötődni, és vizsgáljuk a fehérje jelenlétét.

A vizsgálat tipikusan tartalmaz egy olyan lépést, amelyben a fehérjét egy specifikusan kötő partnerrel hozzuk érintkezésbe, azaz például egy ellenanyaggal, amely vagy közvetlenül, vagy közvetve jelezve van. A megfelelő módszerek közé tartozik az ELISA, amelyben a fehérjével szemben képződő ellenanyagokat, *in vitro* transzlálódott Cdn-t és a fehérjét tartalmazó sejtlyázátumokat használunk. Az élesztő genetikai rendszerek, mint például a Matchmaker (Clontech) szintén alkalmasak arra, hogy a vizsgálatban használjuk őket.

Az alábbi példákat a találmány illusztrálása céljából adjuk meg, nem korlátozzák a találmány oltalmi körét. Hacsak külön nem jelezzük, mindegyik klónozási eljárás megtalálható a Sambrook és munkatársai által írt szakkönyvben [Sambrook és mtsai: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)], és mindegyik reagenst a gyártó előírásai szerint alkalmazzuk.

1. Példa

A *Cdn-1* cDNS azonosítása és klónozása

A *Bcl-2* család hat ismert tagja aminosav szekvenciájának összehasonlítása (6. ábra) kiderítette, hogy van két régió, amely jelentős szekvencia azonossággal rendelkezik, nevezetesen a 14-150-es, valamint a 191-199-es aminosavak. Egy, a *Bcl-2* család új tagjainak azonosítására tett kísérletben az említett régióknak a szekvenciáján alapuló degenerált PCR primereket terveztünk (1. ábra), majd a PCR-t emberi szív cDNS és humán B limfoblasztoid sejtvonal (WI-L2) cDNS alkalma-

zásával hajtottuk végre. A PCR-t a Hot Start/Ampliwax technikával hajtottuk végre (Perkin Elmer Cetus). A PCR primerek és a templát DNS végkoncentrációja 4 μ mol illetve 0,1-0,2 ng/ml volt. A cDNS szintézis körülményei azonosak azzal, amelyet az előzőkben ismertetett cDNS könyvtár első cDNS szálának szintézisére használtunk. A PCR-t Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler-ben végezzük, a Kiefer és munkatársai által módszer szerint [Kiefer és mtsai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 219-225 (1991)], azzal az eltéréssel, hogy az első 10 ciklusban az illesztés és a hosszabítás hőmérséklete 36 °C-volt. A PCR-t követően a mintákat 5 egység DNS polimeráz I Klenow fragmensével kezeljük 30 percig 37 °C-on, majd 7% poliakrilamid, 1xTBE (TRIS/borát/EDTA) összetételű gélben végzett elektroforézissel választjuk el. A 170-210 bázispár között vándorló DNS-t kivágjuk a gélből, passzívan eluáljuk 16 óra hosszat 10 mmol/l TRIS-HCl pH=7,5, 1 mmol/l EDTA összetételű pufferben (TE), majd Elutip-D oszlopon át bocsátva (Schleicher and Schüll) tisztítjuk, a pCR-Script vektorba (Stratagene) ligáljuk és *Escherichia coli* XL1-Blue MRF törzsbe (Stratagene) transzformáljuk. A transzformánsokból származó plazmid DNS-t (fehér telepek), amelyek mind a szív mind a WI-L2 PCR termékeket tartalmazzák a Magic Miniprep DNA Purification System-mel (Promega) izoláljuk, majd a DNS inszerteket szekvenáljuk, a didezoxi láncterminációs módszer alkalmazásával [Sanger és mtsai: *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74, 5463-5467 (1977)] (USB, Sequenase version 2.0). A tizenegy szív PCR termék DNS szekvenciájának elemzéséből kiderült, hogy van két szekvencia, amely azonos a *Bcl-x*-szel [Boise és mtsai: *Cell* 74, 597-608 (1993)], és van tíz más szekvencia, amely nem a *Bcl-2* családba tartozik.

A tizenegy WI-L2 PCR termék DNS szekvenciájának elemzése egy *Bcl-x* szekvenciát eredményezett, valamint öt másik, a *Bcl-2* család egy másik tagjával (bax) azonos szekvenciát [Oldvai és mtsai: *Cell* 74, 609-619 (1993)], négy olyan

szekvenciát, amely nem mutatott rokonságot, és egy új *Bcl-2* szekvenciát, ennek a jelzése *Cdn-1*. A PCR termék által kódolt egyedi *Cdn-1* aminosav szekvencia a 6. ábrán látható a 151-190-es aminosavak között (felső sor).

A *Cdn-1* cDNS izolálására egy emberi szív cDNS könyvtárat (Clontech) és egy Zapf és munkatársai által készített WI-L2 cDNS könyvtárat [Zapf és mtsai: Journal of Biological Chemistry 265, 14892-14898 (1990)] vizsgáltunk át a *Cdn-1* PCR DNS inszertet használva próbaként. A DNS-t ^{32}P -vel jeleztük, Feinberg és Vogelstein módszerével [Feinberg és Vogelstein: Anal. Biochem. 137, 266-267 (1984)], majd ezzel vizsgáltunk át 150,000 telepet, a Kiefer és munkatársai által ismertetett módszerrel [Kiefer és mtsai: Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 219-225 (1991)]. A WI-L2 könyvtárból nyolc pozitív klónt kaptunk. A WI-L2 cDNS könyvtárból nyolc klónt, a szív cDNS könyvtárból két klónt tovább tisztítottunk, majd a cDNS-t tartalmazó plazmid DNS-t kivágtuk a λ ZAPII vektorból (Stratagene) (2. ábra). A két leghosszabb klónt, a W7-et (2,1 kilobázis) és a W5-öt (2,0 kilobázis) megszekvenáltuk, és kimutattuk, hogy tartalmazzák a *Cdn-1* próba szekvenciáját, ezzel megerősítettük az autentikusságukat. A szív cDNS könyvtárból származó két klónt megtisztítottuk. A cDNS-t pBlsc-be szubklónoztuk, majd szekvenáltuk. A szív cDNS is tartalmazza a *Cdn-1* szekvenciát.

A W7 DNS szekvenciát, a számított aminosav szekvenciával együtt a 3. ábrán mutatjuk be. A *Cdn-1* számított aminosav szekvenciáját a *Bcl-2* család egyéb tagjaival is illesztjük a maximális szekvencia azonosság meghatározása céljából, és ezt a 6. ábrán mutatjuk be. Amint az látható, jelentős szekvencia azonosság található a *Cdn-1* és a többi családtag között a 100-as és a 200-as aminosav között. Ezen a központi régió kivül a szekvencia azonosság élesen lecsökken. A *Bcl-2*-höz hasonlóan, a *Cdn-1* is egy intracelluláris fehérjének tűnik, amennyiben nem tartalmaz sem hidrofób szignálpeptidet, sem N-kapcsolt glikozilezési helyet. A *Cdn-1* tartalmaz egy

hidrofób C-terminálist, amely megfigyelhető a *Bcl-2* család összes tagjában is, kivéve az LMW5-HL-t, sugallva ezzel, hogy az anti-apoptotikus aktivitásának a helye, ugyanúgy mint a *Bcl-2*-nél, egy membránhoz kötött sejszervben van, azaz például a mitokondrium membránban, az endoplazmatikus retikulumban vagy a sejtmag membránban [Hockenbery és mtsai (1990); Chen-Levy és mtsai: Mol. Cell. Biology 9, 701-710 (1989); Jacobsen és mtsai: Nature 361, 365-369 (1993); Monighan és mtsai: J. Histochem. Cytochem. 40, 1819-1825 (1992)].

2. Példa

A cDNS klónok Northern blot elemzése

A Northern blot elemzést a Lehrach és munkatársai valamint a Thomas által leírt módszer szerint végezzük [Lehrach és mtsai: Biochem. 16, 4743-4651 (1977); Thomas: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 77, 5201-5205 (1980)]. Emellett egy humán többszörös szöveti Northern blottot vásároltunk a Clontech-től. A *Bcl-2* és a *Cdn-1* cDNS-ek kódoló régióit a random priming módszerrel jelezzük, Feinberg és Vogelstein módszerével [Feinberg és Vogelstein: Anal. Biochem. 137, 266-267 (1984)]. A hibridizálási és mosási körülmények megfeleltek a Kiefer és munkatársai által leírt körülményeknek [Kiefer és mtsai: Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 219-225 (1991)]. Részletesebben, a *Bcl-2* és *Cdn-1* klónok Klenow fragmenssel jelzett fragmenseit egy többszörös humán szöveti Northern blothoz hibridizáltuk (Clontech 7760-1) minden egyes próbánál 1×10^6 cpm/milliliter koncentrációban. A blottot nagyon szigorú körülmények között mostuk.

A 4. ábrán bemutatott eredmények azt jelzik, hogy a *Cdn-1* minden vizsgált szervben expresszálódik (agy, szív, méhlepény, tüdő, máj, vázizom, vese és hasnyálmirigy), míg a *Bcl-2* nem expresszálódik, vagy csak alacsony szinten expresszálódik a szívben, agyban, tüdőben és májban. A *Cdn-1*-ről tehát úgy tűnik,



hogy sokkal szélesebb körben expresszálódik az emberi szervezetben mint a *Bcl-2*, és ezért sokkal fontosabb lehet ezekben a szervezetben az apoptózis szabályozásában.

3. Példa

A rekombináns *Cdn-1* expressziója

Ahhoz, hogy a rekombináns *Cdn-1*-et a bakulovírus rendszerben expresszáljuk, az 1. példában előállított *Cdn-1* cDNS-t használjuk egy új *Cdn-1* vektor előállítására, az 1. példában ismertetett PCR módszerrel, a gén 3' és 5' határoló régióiból származó primereket használva, amelyek a klónozás megkönnyítésére restrikciós hasítási helyeket tartalmaznak. A plazmidokat a didezoxi láncterminációs módszer alkalmazásával szekvenáljuk [Sanger és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74, 5463-5467 (1977)] szekvenáló kettek (USB, Sequenase version 2.0) és belső primerek alkalmazásával. Ennek az a célja, hogy megerősítsük, nem származott mutáció a PCR-ből

Egy klónt használtunk rekombináns vírusok előállítására *in vivo* homológ rekombinációt alkalmazva, a plazmid és a vad típusú AcNPV bakulovírus átfedő szekvenciáinak felhasználásával. 48 órával a 9-es *Spodoptera frugiperda* rovarklón (SF9) sejteinek transzfekciója után a rekombináns vírusokat kinyerjük, PCR-rel azonosítjuk, majd tovább tisztítjuk. A rekombináns bakulovírus szelektálására, átvizsgálására és szaporítására kidolgozott standard módszereket használjuk (Invitrogen). A bakulovírus rendszerben előállított fehérje molekulatömegét nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) alapján hasonlítjuk össze a *Cdn-1*-nek az aminosav sorrend alapján számított molekulatömegével.

Emellett hasonló klónok expresszálhatók előnyösen egy élesztő intracelluláris expressziós rendszerben, bármelyik, a szakterületen ismert módszert alkalmazva,

beleértve a Barr és munkatársai által ismertetett módszert is [Barr és mtsai: Transgenesis, szerk.: JAH Murray (Wiley and Sons), 55-79 (1992)].

4. Példa

A *Cdn-1* expressziója emlős rendszerben

A *Cdn-1*-et kódoló szekvenciát kivágjuk az 1. példában előállított plazmidból, majd bevisszük a pCEP7, pREP7 és pcDNA3 (Invitrogen) vektorokba, a kompatibilis restrikciós enzim hasítási helyekre. A pCEP7-et úgy állítjuk elő, hogy a pREP7 RSV 3'-LTR-t XbaI/Asp718 restrikciós enzimes emésztéssel eltávolítjuk, majd pCEP4-ből (Invitrogen) származó CMV promoterral helyettesítjük. Mindegyik *Cdn-1*-et tartalmazó plazmidból 25 µg-ot elektroporálunk a WI-L2 B limfoblasztoid sejtvonalba, majd szelektáljuk a *Cdn-1*-et expresszáló stabil higromicin rezisztens transzformánsokat vagy G418 rezisztens transzformánsokat (pcDNS3 konstrukciók, 8. ábra).

A *Cdn*-ek kódoló régióit ligálhatjuk olyan expressziós vektorokba is, amelyek képesek arra, hogy stabilan integrálódjanak egyéb sejttípusokba, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a kardiomiocitákat, neurális sejtvonalakat, azaz például a GTI-7-et és a TNF-érzékeny sejteket, azaz például a HT29 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalat, ezzel számos különböző vizsgáló rendszert hozva létre a *Cdn-1* által szabályozott apoptózis követésére.

5. Példa

A *Cdn-1* és származékai anti-apoptotikus aktivitásának hatása a WI-L2-729

HF2 vad típusú B limfoblasztoid sejtvonalakban és a fölös mennyiségben

Cdn-1-et expresszáló transzformált sejtekben

2x10⁵ WI-L2 sejtet, valamint ugyanennyi, a 4. példában leírtak alapján a *Cdn-1*-et kódoló vektorral transzformált WI-L2 sejtet szaporítunk RPMI táptalajban, ame-

lyet 10% borjúmagzat szérummal (FBS) egészítettünk ki az anti-FAS kísérlethez, vagy 0,1% FBS-sel a szérum-megvonásos kísérletekhez. Az anti-fas kísérletben a friss táptalajjal való mosás után a sejteket 10% FBS-sel kiegészített RPMI-ben szuszpendáljuk, anti-fas ellenanyagokkal hozzuk érintkezésbe, majd áramlási citometriával (FACS) elemezzük az apoptózis-indukáló ágensre adott válaszként létrejött sejtpusztulást. A szérum-megvonásos kísérletekben a WI-L2 sejteket 0,1% FBS-sel kiegészített RPMI-ben szuszpendáljuk, majd követjük az apoptózist, a Henderson és munkatársai által ismertetett módszerrel [Henderson és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 90, 8479-8483 (1993)]. Más apoptózist indukáló módszer lehet, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az oxigén megvonása a primer szívmyocitákban, az NGF megvonás, a glutation kimerítés a GTI-7 neurális sejtvonalban, vagy a TNF hozzáadása a HT29 sejtvonalhoz. Az apoptózist a sejtek zsugorodása, és pusztulásuk során a propidium-jodid permeabilitása alapján becsüljük meg. Emellett az apoptotikus sejtpusztulás bármely egyéb módszere is használható.

A 9. ábrán a különböző WI-L2 transzformánsoknak az anti-Fas kezelésre adott anti-apoptotikus válasza látható. A 8. ábrán látható a különböző WI-L2 transzformánsoknak a szérum-megvonásra adott anti-apoptotikus válasza. A 9. ábrán látható esetben 3×10^5 sejtet tartalmazó duplikát lukákat inkubálunk 50 ng/ml citocid anti-Fas ellenanyaggal 24 óra hosszat. A sejtpusztulást azután áramlási citometriával vizsgáljuk, FACScan berendezésben. Az egyes konstrukciókban expresszáldó fehérjéket az oszlopok alján mutatjuk be. Mivel számos konstrukció csonkított vagy deléciós variáns, ezért az expresszált pontos aminosav szekvenciát is bemutatjuk. Amint az látható, mindegyik transzformánsnak van valamennyi védő hatása, ha a csak pREP7 vektort tartalmazó kontroll transzformánsokkal hasonlítjuk össze. Az apoptózisnak legjobban ellenálló transzformáns a *Cdn-1Δ2-T* expresszáldó



sejtvonal, amelyben a sejteknek több mint 90%-a túlélte az anti-fas kezelést. Jelen-tős védő hatás figyelhető meg a teljes hosszúságú *Cdn-1*-et (1-211) és a *Cdn-1Δ1*-et expresszáló transzformánsokban, ezeket követik a *Bcl-2Δ*-t és a *Bcl-2*-t expresszáló sejtvonalak.

A *Cdn-1Δ1*-ből és a *Cdn-1Δ2*-ből hiányoznak a teljes hosszúságú *Cdn-1* 59 illetve 70 N-terminális aminosavat kódoló nukleotidok. Az a megfigyelés, hogy a *Cdn-1Δ2* expressziója hatékonyabban blokkolja az apoptózist mint a teljes hosszúságú *Cdn-1*, azt sugallja, hogy a kisebb, csonkított *Cdn-1* molekulák potenciális gyógyszerek lehetnek.

6. Példa

Egyéb *Cdn* gének meghatározása és a *Cdn-2* gén klónozása

A humán genomiai DNS-ek, valamint egy humán/rágcsáló szomatikus sejt DNS-ek paneljének Southern blot elemzése azt mutatja, hogy legalább 3 *Cdn*-nel rokon gén van, és ezek a 6-os, 11-es és 20-as kromoszómán található. A három hibrid DNS PCR/szekvencia elemzése azt mutatja, hogy a *Cdn-1* a 6-os kromoszómán található, és a két, vele közeli rokonságban levő szekvencia a 20-as kromoszómán (jele *Cdn-2*) illetve a 11-es kromoszómán (jele *Cdn-3*) található. Klónoztuk a *Cdn-2* és a *Cdn-3* gént, majd meghatároztuk a szekvenciájukat. Érdekes módon sem a *Cdn-2*, sem a *Cdn-3* nem tartalmaz intronokat, és minden olyan tulajdonságuk megvan, ami a genomba visszakerült, processzált géneknek. A *Cdn-3*-ban van egy nukleotid deléció, amely a leolvasási keret eltolódását és korai terminációt okoz, ezért ez valószínűleg egy pszeudogén. Mindkettőnek vannak azonban promoter elemei (CCAAT és TATAAA boxok), de ezek valószínűleg nem íródnak át, amit a

Cdn-2 és a *Cdn-3* specifikus próbákkal végzett Northern blot elemzéssel lehet meghatározni.

900,000, humán méhlepény genomiális könyvtárból származó, a pWE15 kozmid vektorban készített klónt (Stratagene, La Jolla, CA) vizsgálunk át egy 950 bázispár méretű BglII-HindIII cDNS próbával, amely a *Cdn-1* teljes kódoló régióját tartalmazza. A próbát ^{32}P -vel jelezzük, Feinberg és Vogelstein módszerével [Feinberg és Vogelstein: Anal. Biochem. 137, 266-267 (1984)]. A könyvtárat feldolgozzuk, majd szigorú hibridizálási és mosási körülmények között átvizsgáljuk [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. Tíz darab duplán pozitív klónt tovább tisztítunk, az előzőekben ismertetett módon újra szélesztve és átvizsgálva őket. A plazmid DNS-t a Wizard Maxiprep DNA Purification System-mel tisztítjuk, az előállító leírása szerint (Promega Corp., Madison, WI), utána EcoRI restrikciós enzimes térképezéssel és Southern blotolással ellenőrizzük. A Southern blothoz használt próba és a hibridizálási körülmények ugyanazok, mint amelyeket az előzőekben alkalmaztunk.

Az EcoRI restrikciós elemzés és a Southern blot alapján a kozmid klónok két csoportra oszthatók. Az 1-4 és 7 kozmid klónok (*cos*) EcoRI restrikciós enzim által generált fragmensei egy megkülönböztethető mintázatot mutatnak, és egyetlen, 6,5 kilobázis méretű, hibridizálódó EcoRI fragmenst tartalmaznak. A második csoportba tartozik a *Cos2* és a *Cos9*, amelyeket egy 5,5 kilobázis méretű hibridizálódó EcoRI fragmens jellemez. A *cos2*-ből származó 6,5 kilobázis méretű DNS fragmenst és a *cos9*-ből származó 5,5 kilobázis méretű DNS fragmenst pBluescript SK plazmidba (Stratagene, La Jolla, CA) szubklónozzuk, standard molekuláris biológiai technikákat alkalmazva [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. A plazmid DNS-t izoláljuk, majd a két szubklónból, az A4-ből (a *cos2*) és a C5-ből (*cos9*) származó plazmid



DNS-t BamHI, HindIII és EcoRI restrikciós enzimekkel térképezzük, utána az előzőkben ismertetett módon Southern blottolással elemezzük. A két klónból származó kisebb restrikciós fragmenseket M13 szekvenáló vektorokba szubklónozzuk, és meghatározzuk a DNS szekvenciájukat.

Az A4 szekvenciája tartalmaz egy nyitott leolvasási keretet, amely 97%-os aminosav szekvencia azonosságot mutat a *Cdn-1*-gyel (5. ábra). Ennek a génnek a *Cdn-1*-gyel mutatott magasfokú szekvencia-azonossága azt jelzi, hogy ez egy új, *Cdn-1*-gyel rokon gén, ezért a *Cdn-2* elnevezést kapta. A kódolt *Cdn-2* fehérje és a *Bcl-2* család egyéb tagjai szekvencia összehasonlítása a 6. ábrán látható. A *Cdn-2* tartalmazza a BH1 és BH2 konzerválódott régiókat, amelyek a *Bcl-2* családot fémjelzik, és alacsonyabb teljes szekvencia hasonlóságot (körülbelül 20-30%) mutat a többi taghoz, ami szintén a *Bcl-2* család tagjaira jellemző. A *Cdn-3*-ban van egy leolvasási keret eltolódás, ami egy rövidebb, nem rokon polipeptidet eredményez, ennek következtében nem tartalmazza a *Cdn-1*, a *Cdn-2* vagy a *Bcl-2* család egyéb tagjaira jellemző tulajdonságokat.

7. Példa

A *Cdn-1*, *Cdn-2* és *Cdn-3* gének kromoszomális lokalizációja

Egy humán/rágcsáló szomatikus sejthibrid DNS panel (Panel #2 DNS a NIGMS-től, Camden, NJ) Southern blot elemzését és a metafázis kromoszómák fluoreszcenciás *in situ* hibridizációját használjuk a *Cdn* gének humán kromoszómákra való térképezéséhez. A Southern blottoláshoz 5 µg hibrid panel DNS-t emésztünk EcoRI vagy BamHI/HindIII restrikciós enzimmal, majd 0,8%-os vagy 1%-os agaróz gélen fracionáljuk, nitrocellulóz membránra visszük át, majd a *Cdn-1* próbával hibridizáljuk. A hibridizálási és mosási körülmények megfelelnek az előzőkben ismertetetteknek. Az FISH-hoz az A4 *Cdn-2* szubklónt biotinilezzük a Bionick Labeling

System-mel (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), és humán fibroblasztokból származó metafázisos kromoszómákhoz hibridizáljuk, a Viegas-Pequignot által ismertetett módszerrel [Viegas-Pequignot: "In Situ Hybridization, A Practical Approach", szerk.: D.G. Wilkinson, 137-158, IRL Press, Oxford (1992)]. A FITC-konjugált avidint és kecske anti-avidint alkalmazó próba-kimutatást Pinkel és munkatársai módszerével végezzük [Pinkel és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 85, 9138-9142 (1988)].

A Southern blot elemzéssel három hibridizálódó csík mutatható ki a humán kontroll DNS-ben, amelyeknek a mérete körülbelül 12 kilobázis, 11 kilobázis és 5,5 kilobázis. A szomatikus sejthibrid DNS azt mutatja, hogy a 12 kilobázisos csík két különböző mintában fordul elő, az NA10629-ben, amely csak a 6-os humán kromoszómát tartalmazza és az NA07299-ben, amely mind az 1-es mind az X humán kromoszómát tartalmazza, valamint, lényeges, a 6-os kromoszómának a p21-hez telomer részét. A 11 kilobázis méretű csík az NA13140-ben fordul elő, amely a 20-as humán kromoszómát tartalmazza. Az 5,5 kilobázis méretű csíkot csak az NA10927A minta tartalmazza, amelyben a humán 11-es kromoszóma található meg. Ezeknek a hibrid DNS mintáknak a PCR/DNS szekvenáló elemzése, a *Cdn-1*, *Cdn-2* vagy *Cdn-3* primerek felhasználásával azt mutatja, hogy az NA10629-ben (a hibrid DNS-t tartalmazó 6-os kromoszóma) és az NA07299-ben (az 1-es, X és a 6pter>p21-et tartalmazó hibrid DNS) *Cdn-1* szekvenciák találhatóak, jelezve ezzel, hogy a *Cdn-1* gén a 6-os kromoszómán található, a p21-hez telomer helyzetben. A *Cdn-2* szekvenciákat az NA13140 mintában lehet megtalálni, jelezve ezzel, hogy a *Cdn-2* gén a 20-as kromoszómán található, a *Cdn-3* szekvenciát az NA10927A mintában lehet megtalálni, ami azt mutatja, hogy a *Cdn-3* gén a 11-es kromoszómán található.

8. Példa

Az apoptózis befolyásolása *Cdn-1*-gyel és *Cdn-2*-vel FL5.12 sejtekben

Az FL5.12 egy IL-3 dependens limfoid őssejt vonal [McKearn és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 82, 7414-7418 (1985)], amelyről kimutatták, hogy apoptózison megy át az IL-3 megvonása után, de a *Bcl-2* túlexpressziójával megvédhető a sejtpusztulástól [Nunez és mtsai: J. Immunol. 144, 3602-3610 (1990); Hockenbery és mtsai: Nature 348, 334-335 (1990)]. A *Cdn-1* és *Cdn-2* apoptózist befolyásoló hatásának becslésére a *Cdn-1*-et, *Cdn-2*-t, a *Cdn-1* két csonkított formáját (lásd az alábbiakban) és a *Bcl-2*-t kódoló cDNS-eket a pcDNA3 emlős expressziós vektorba klónozzuk (Invitrogen, San Diego, CA) ligáljuk, majd elektroporációval stabilan bejuttatjuk az egér FL5.12 B limfocita őssejt vonalba, majd G418-at tartalmazó táptalajon szelektáljuk. A vizsgálatokat nagy mennyiségű transzformánson végezzük, az előzőekben ismertetett módon.

A túlexpresszált géneknek az FL5.12 sejtek életképességére gyakorolt hatásait különböző időpontokban vizsgáljuk, az IL-3 megvonását követően, az eredmények a 10. ábrán láthatók. A sejtek életképességét propidium-jodid (PI) kizárással mérjük áramlási citométerben (Becton Dickinson FACScan). A *Bcl-2* expresszió jelentős mértékben védi a sejteket a sejtpusztulástól, míg a *Cdn-1* láthatóan fokozza a sejtpusztulást, a kontroll vektorral összehasonlítva. A korábbi időpontokban a *Cdn-2* expresszió alacsony szintű védelmet biztosít a sejtpusztulással szemben, a későbbi időpontokban pedig egyáltalán semmi védelmet nem biztosít. Érdekes módon a *Cdn-1 Δ 2* közepes szintű védelmet biztosít a sejtpusztulással szemben. A *Cdn-1-112*, azaz az a molekula, amely a *Cdn-1* 112 N-terminális aminosavát tartalmazza, szintén részleges védelmet nyújtott az FL5.12 sejteknek, bár jóval alacsonyabb szinten, mint a *Bcl-2*.

Amint az a 7. ábrán látható, a *Cdn-1* és a *Cdn-1 Δ 2* expressziója WI-L2 sejtekben fokozott túlélést biztosít a sejteknek az anti-Fas által közvetített apoptózissal és a szérum-megvonással szemben. Ezeket az adatokat összerakva az derül ki, hogy a különböző *Cdn* molekulák képesek befolyásolni az apoptózist, pozitív vagy negatív módon, a sejt típusától és az apoptotikus stimulustól függően. Tehát hatékonyan akadályozzák meg a sejtpusztulást, például a szívben a poszt-iszkémiás reperfüzió által okozott szövetkárosodást, vagy hatékonyan indukálják a sejtpusztulást olyan sejtekben, amelyek kikerültek az apoptotikus szabályozás alól, azaz például a különböző rákok esetében.

9. Példa

Az IFN- γ *Cdn-1* expressziót indukál HT-29 sejtekben

Kiderült, hogy a H-29 humán vastagbél karcinóma sejtvonal csak IFN- γ kezelés után érzékeny az anti-FAS ellenanyag vagy a TNF citotoxikus hatására [Yonahara és mtsai: J. Exp. Med. 169, 1747-1756 (1989)]. Ezek az IFN- γ -val kezelt sejtek szintén fokozott apoptózist mutatnak szérum-megvonás vagy cikloheximid kezelés után. A HT-29 sejteknek ez az apoptotikus serkentésekre mutatott indukált érzékenysége részben a TNF receptor és a Fas antigén ezzel együttjáró felszabályozásának következménye, ami az IFN- γ kezelés után figyelhető meg [Yonahara és mtsai: J. Exp. Med. 169, 1747-1756 (1989)]. Azonban a szérum-megvonás vagy a cikloheximid kezelés után látható fokozott sejtpusztulás azt sugallja, hogy egy másik mechanizmust indukálhat az IFN- γ .

A *Bcl-2* család tagjai szintjének befolyásolása az IFN- γ -val azonban egy másik lehetséges mechanizmusa a HT-29 sejtek apoptotikus stimulusokra mutatott fokozott érzékenységének. A *Cdn-1*, Bax vagy *Bcl-X_s* expresszió fokozódása, és/vagy a *Bcl-2*

vay *Bcl-X_L* expresszió csökkenése eredményezheti a sejteknek a citocid ágensekkel szembeni fokozott érzékenységét. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára a *Bcl-2* család tagjainak mRNS szintjét a kezeletlen és az IFN- γ -val kezelt HT-29 sejtekben Northern blot elemzéssel vizsgáljuk, a 2. példában ismertetett módszerek és körülmények alkalmazásával. A *Cdn-1* mRNS szintje körülbelül tízszeresre nőtt az IFN- γ indukciót követően, míg a *Bax* és a *Bcl-x* mRNS szint változatlan maradt. A *Bcl-2* mRNS a kimutatható szint alatt maradt mind a kezeletlen mind az IFN- γ -val kezelt sejtekben. Az valószínű maradt, hogy a *Bcl-X_S*-nek a *Bcl-X_L* transzkriptumokhoz viszonyított aránya megnő az IFN- γ kezelés hatására, de nem mutatható ki Northern blot elemzéssel, mivel kicsi a két transzkriptum méretének az eltérése. Ez volt a helyzet a serkentetlen és a PMA-val plusz ionomicinnel serkentett timociták esetében [Boise és mtsai: *Cell* 74, 597-608 (1993)]. Félkvantitatív PCR alkalmazásával kimutatták, hogy a *Bcl-X_S*-nek a *Bcl-X_L*-hez viszonyított aránya megnő a serkentést követően. Hasonló PCR technikák alkalmazásával kimutatták, hogy a *Bcl-x_S* mRNS szintje a *Bcl-x_L* mRNS szintjéhez viszonyítva nem változik a HT-29 sejtek IFN- γ -val való kezelése hatására, és a túlsúlyban levő transzkriptum a *Bcl-x_L* (>90%).

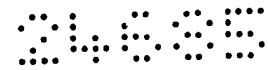
Tehát pozitív korreláció van a *Cdn-1* transzkriptumok felszabályozása és a HT-29 sejtvonal, az IFN- γ -kezelést követően és a sejtpusztulással szemben mutatott fokozott érzékenység között. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *Cdn-1*-nek vannak pozitív modulátorai a tumorsejtekben, és ezek hasznosak lehetnek néhány tumor kezelésében, ha együtt adjuk őket a megfelelő apoptózis indukáló ágensekkel.

Jóllehet az ismertetett találmányt bizonyos részletességgel leírtuk az illusztrálás céljából, és azért, hogy világos és érthető legyen, az nyilvánvaló a szakterületen jártas szakember számára, hogy bizonyos változtatások és módosítások tehetők

benne. Ennek következtében a leírás és a példák nem használhatók fel a találmány oltalmi körének korlátozására, amelyet a mellékelt igénypontok körvonalaznak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Készítmény, amely egy *Cdn*-t kódoló, lényegében tisztított nukleotid szekvenciát tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amelyben a nukleotid szekvencia genomiális DNS-ből származik.
3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-1*.
4. A 3. igénypont szerinti készítmény, amelynek nukleotid szekvenciája a 3. ábrán látható.
5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-2*.
6. Az 5. igénypont szerinti készítmény, amelynek nukleotid szekvenciája az 5. ábrán látható.
7. Készítmény, amely egy *Cdn*-t kódoló rekombináns DNS vektort tartalmaz.
8. A 7. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-1*.
9. A 8. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját a 3. ábrán láthatjuk.
10. A 7. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-2*.
11. A 10. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját az 5. ábrán mutatjuk be.
12. A 7. igénypont szerinti rekombináns DNS vektor, amelyben a *Cdn*-t kódoló szekvencia expressziója egy indukálható promoter szabályozása alatt áll.
13. Készítmény, amely egy *Cdn*-t kódoló rekombináns DNS vektorral transzfektált sejtet tartalmaz.
14. A 13. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-1*.



15. A 14. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját a 3. ábrán mutatjuk be.
16. A 13. igénypont szerinti készítmény, amelyben a *Cdn* a *Cdn-2*.
17. A 16. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját az 5. ábrán mutatjuk be.
18. Transzgenikus állat, amely egy *Cdn*-t kódoló rekombináns DNS vektort tartalmaz.
19. A 18. igénypont szerinti transzgenikus állat, amelyben a *Cdn* a *Cdn-1*.
20. A 19. igénypont szerinti transzgenikus állat, amelynek a *Cdn* nukleotid szekvenciáját a 3. ábrán mutatjuk be.
21. A 19. igénypont szerinti transzgenikus állat, amelyben a *Cdn* a *Cdn-2*.
22. A 22. igénypont szerinti transzgenikus állat, amelynek a *Cdn* nukleotid szekvenciáját az 5. ábrán mutatjuk be.
23. Készítmény, amely egy lényegében megtisztított *Cdn* fehérjét tartalmaz.
24. A 23. igénypont szerinti készítmény, amelyben a fehérje a *Cdn-1*.
25. A 24. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját a 3. ábrán mutatjuk be.
26. A 23. igénypont szerinti készítmény, amelyben a fehérje a *Cdn-2*.
27. A 26. igénypont szerinti készítmény, amelynek a nukleotid szekvenciáját az 5. ábrán mutatjuk be.
28. A 23. igénypont szerinti készítmény, amelyben a fehérjéket rekombináns DNS-sel expresszáljuk.
29. A 23. igénypont szerinti készítmény, amelyben a fehérjék natív fehérjék.

30. Készítmény, amely a 23. igénypont szerinti fehérjéket és egy gyógyászatilag elfogadható puffert tartalmaz.

31. A 30. igénypont szerinti készítmény, amelyben a fehérjék terápiásan hatásos mennyiségben vannak jelen.

32. Készítmény, amely egy monoklonális vagy poliklonális ellenanyagot tartalmaz, amely felismeri a Cdn-t, de lényegében nem képes reagálni a Bcl család egyéb tagjaival.

33. Eljárás egy Cdn fehérje jelenlétének kimutatására egy biológiai mintából, amely a következő lépéseket tartalmazza:

- a) előállítjuk a sejtmintát;
- b) a sejteket lizáljuk, vagy az ellenanyagokkal szembeni permeabilizáljuk;
- c) anti-Cdn-specifikus ellenanyagokat adunk a sejtmintához;
- d) a sejtmintát olyan körülmények között tartjuk, amelyek lehetővé teszik, hogy az ellenanyagok komplexet képezzenek a Cdn-nel; és
- e) kimutatjuk a keletkező ellenanyag-Cdn komplexeket.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Cdn a Cdn-1.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvenciát a 3. ábrán mutatjuk be.

36. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Cdn a Cdn-2.

37. A 36. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvenciát az 5. ábrán mutatjuk be.

38. A 32. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejtmintát T-sejteket tartalmaz.

39. Eljárás egy *Cdn* expressziójának kimutatására egy biológiai mintában, azzal jellemezve, hogy azt a lépést tartalmazza, amellyel kimutatjuk a *cdn*-t kódoló RNS jelenlétét.

40. A 39. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Cdn-1* vagy *Cdn-2* mRNS kimutatására használt módszer a Northern blot.

41. Eljárás a *Cdn* mRNS kimutatására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket tartalmazza:

a) előállítjuk a sejtmintát;

b) RNS-t állítunk elő a sejtmintából;

c) polimeráz láncreakciót végzünk az RNS-sel, a *Cdn* egyedi régióinak megfelelő RNS primereket alkalmazva; és

d) kimutatjuk a polimeráz láncreakció termékeinek jelenlétét.

42. Eljárás az apoptózis által indukált sejtpusztulás befolyásolására, azzal jellemezve, hogy befolyásoljuk a *Cdn* endogén szintjét.

43. A 40. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Cdn* a *Cdn-1*.

44. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvenciát a 3. ábrán mutatjuk be.

45. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Cdn* a *Cdn-2*.

46. A 45. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvenciát az 5. ábrán mutatjuk be.

47. A 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a *Cdn* mennyisége megnő, egy endogén *cdn* gén expressziójának befolyásolása következtében.

48. A 46. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az expresszált *Cdn* gént egy rekombináns gén kódolja.

49. A 48. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gén expressziója egy indukálható promoter ellenőrzése alatt áll.

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejteket *ex vivo* transzfektáljuk, majd a transzfektált sejteket visszajuttatjuk az állatba.

51. Az 50. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejtek T-limfociták.

52. A 49. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns gént a sejtekbe *in vivo* transzfektáljuk.

53. Eljárás apoptózis kezelésére egy ilyen kezelésre szoruló betegben, azzal jellemezve, hogy a Cdn-t terápiásan hatásos mennyiségben adjuk be.

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Cdn a Cdn-1.

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia a 3. ábrán látható.

56. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Cdn a Cdn-2.

57. Az 56. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a nukleotid szekvencia az 5. ábrán látható.

58. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a Cdn-t olyan indikáció esetén adjuk be, amelyre szuperoxid diszmutázt adtak eddig.

59. Eljárás a Cdn-ek és a Cdn-ekhez specifikusan kötődő fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálatára, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

a tisztított Cdn-t érintkezésbe hozzuk a Cdn-hez esetleg kötődő fehérjét tartalmazó sejtlizátumokkal, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a fehérje és a Cdn kötődését;

izoláljuk a Cdn-t;

az izolált Cdn-t érintkezésbe hozzuk a fehérjére specifikus kötő partnerrel, olyan körülmények között, amelyek lehetővé teszik a kötő partner és a Cdn kötődését; és

megmérjük a fehérjéhez kötött kötő partner mennyiségét.

60. Az 59. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a sejtízátum egy élesztő lizátum.

61. Az 59. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kötő partner egy ellenanyag.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G.I. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Handwritten notes:
 38 oldal
 26 oldal

 64 oldal
 26.08.26
 [Signature]

9601448

96

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

1/26

5' - AGATCTGAATTC AA(C/T) TGG GGI (C/A)GI (A/G)TX GTX GC -3'

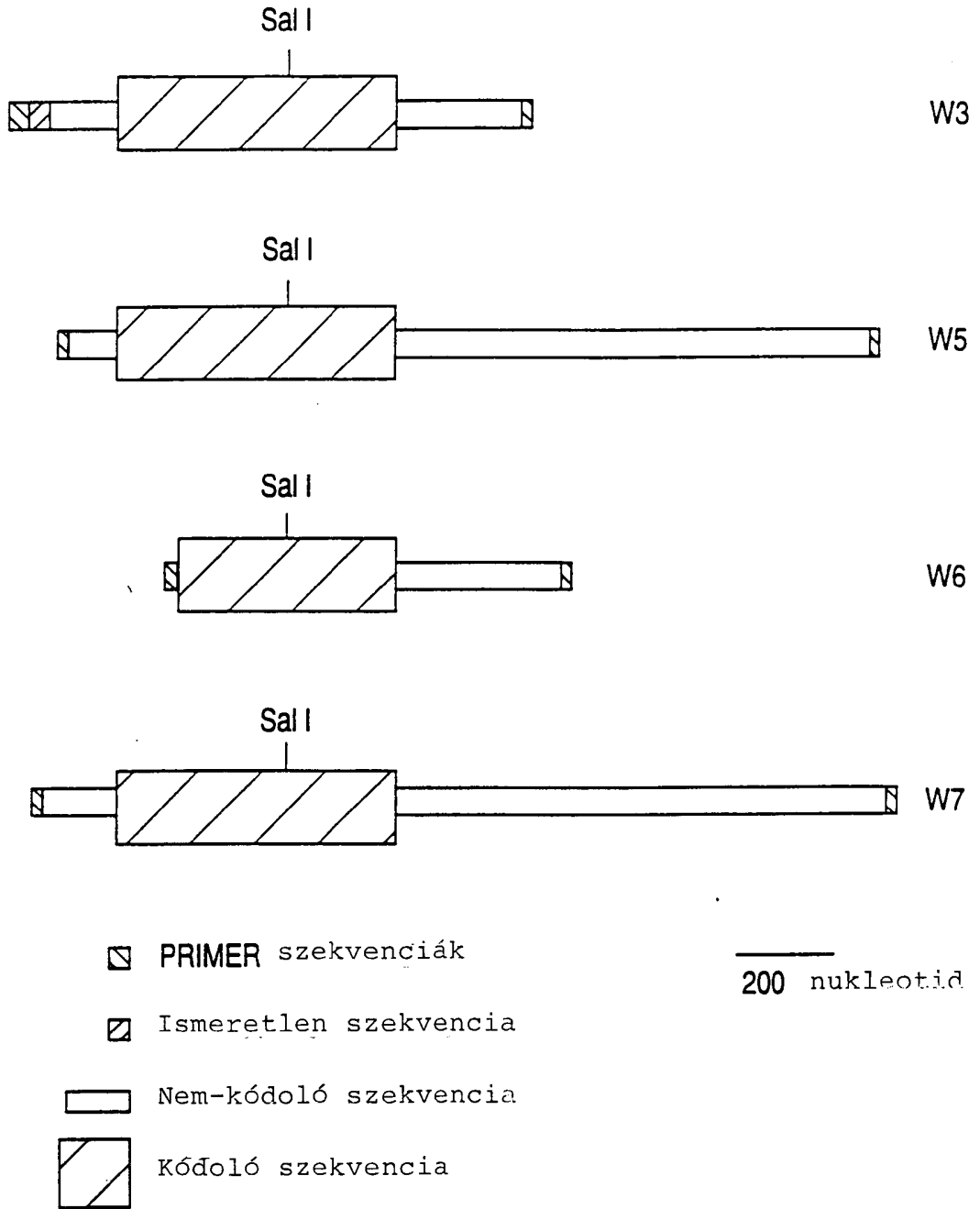
Bclx 1-32

5' - AGATCTAAGCTT GTC CCA ICC ICC XTG XTC (C/T)TG (A/T/G)AT CCA -3'

Bclx 2-39

1. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
Szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. és K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



2. ábra

Iff. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



>SalI

640

CTG ACT GGC TTC CTA GGC CAG GTG ACC CGC TTC GTG GTC GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT GCC
 L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I A>

720

CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG AAC
 R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L N>

800

GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA TGA
 V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S *>

>AflII

880

CTCCCAA GGGTGCCTT TGGGTCCCGG TTCAGACCCC TGCCTGGACT TAAGCGAAGT CTTTGCCTTC TCTGTTCCCT

>HindIII

960

TGCAGGGTCC CCCCTCAAGA GTACAGAAGC TTTAGCAAGT GTGCACTCCA GCTTCGGAGG CCCTGCGTGG GGGCCAGTCA

>PstI

>ApaI

1040

GGCTGCAGAG GCACCTCAAC ATTGCATGGT GCTAGTGCCC TCTCTCTGGG CCCAGGGCTG TGGCCGTCTC CTCCTCAGC

1120

TCTCTGGGAC CTCCTTAGCC CTGTCTGCTA GGCCTGGGG AGACTGATAA CTTGGGGAGG CAAGAGACTG GGAGCCACTT

1200

CTCCCCAGAA AGTGTTTAAC GGTTTTAGCT TTTTATAATA CCCTTGTGAG AGCCATTCC CACCATTCTA CCTGAGGCCA

>AhaII

1280

GGACGTCTGG GGTGTGGGGA TTGGTGGGTC TATGTTCCCC AGGATTCAGC TATTCTGGAA GATCAGCACC CTAAGAGATG

1360

GGACTAGGAC CTGAGCCTGG TCCTGGCCGT CCCTAAGCAT GTGTCCCAGG AGCAGGACCT ACTAGGAGAG GGGGGCCAAG

3b. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
 Azabadosi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



```

                                1440
      *           *           *           *           *           *           *
GTCCTGCTCA ACTCTACCCC TGCTCCCATT CCTCCCTCCG GCCATACTGC CTTTGCAGTT GGACTCTCAG GGATTCTGGG

                                1520
      *           *           *           *           *           *           *
CTTGGGGTGT GGGGTGGGGT GGAGTGCAG ACCAGAGCTG TCTGAACTCA CGTGTCAGAA GCCTCCAAGC CTGCCTCCCA

                                1600
      *           *           *           *           *           *           *
AGGTCCTCTC AGTTCTCTCC CTTCTCTCT CTTATAGAC ACTTGCTCCC AACCCATTCA CTACAGGTGA AGGCTCTCAC

                                1680
      *           *           *           *           *           *           *
CCATCCCTGG GGGCCTGGG TGAGTGGCCT GCTAAGGCTC CTCCTTGCC AGACTACAGG GCTTAGGACT TGGTTTGTTA

                                1760
      *           *           *           *           *           *           *
TATCAGGGAA AAGGAGTAGG GAGTTCATCT GGAGGGTCT AAGTGGGAGA AGGACTATCA ACACCACTAG GAATCCAGA

>BamH1
      |
                                1840
      *           *           *           *           *           *           *
GGTGGATCCT CCCTCATGGC TCTGGCACAG TGTAATCCAG GGTGTAGAT GGGGAACTG TGAATACTG AACTCTGTTC

                                1920
      *           *           *           *           *           *           *
CCCCACCCTC CATGCTCTC ACCTGTCTAG GTCTCCTCAG GGTGGGGGT GACAGTGCCT TCTCTATTGG CACAGCCTAG

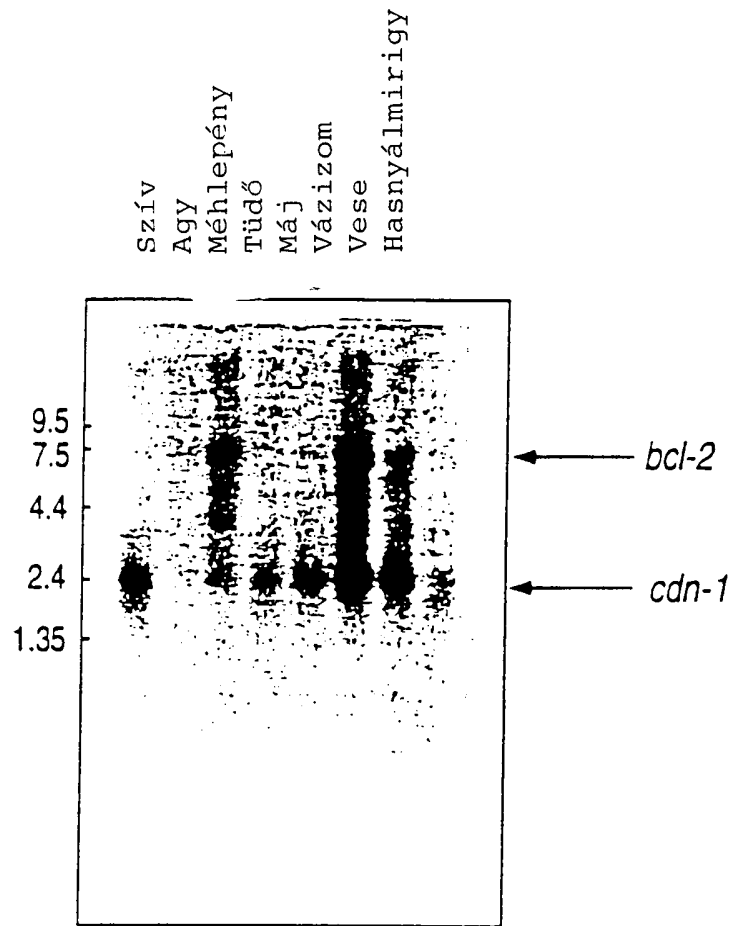
                                2000
      *           *           *           *           *           *           *
GGTCTTGGGG GTCAGGGGGG AGAAGTTCTT GATTCAGCCA AATGCAGGGA GGGGAGGCAG ATGGAGCCCA TAGGCCACCC

      *           *           *           *           *
CCTATCCTCT GAGTGTTTGG AAATAAAGT TGCAATCCCC TCAAAAAAAAA AA

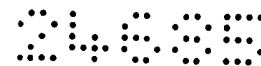
```

3c. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
H-1062 Budapest, Andrassy út 113.
tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



4. ábra

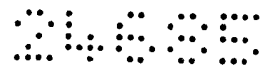


7/26

```
>EcoRI                               >BamH1
|                                     |
* * * * *
GAATTC CCGCAATTA CCCTCACTAA AGGGATCCTC CTGCCTTGGT CTCCCAAAT GTTGAGATTA TAGGCATGAG
* * * * *
CCCACCACGC CTGGCTGGGG TTTTGT TTTT GTTTTTTAA CATTGTGAC ATTCACAAA GGTATTCAG AATCTCTGAG
* * * * *
AAAAGTGCTA TAATGTCTAA TGATACTTTA TATTTGGACA GCACTTTCGT TTGTTTTTTT TGGCGGGGGG GGTGGGAGAA
* * * * *
GTC AAGTAAC TTACATATAG TGAAATTTAC CCTTCTTGAG TATGCAGTTC AGTGAGTTTT GATAAATGTG TAATGGTAGT
* * * * *
GTAATCACTA CCACAGTCAA GACATGGACA ATTTTCATTA CCCACGAAG GTCCTCATG TGTGGTTAGA GTCAGCCCTC
* * * * *
CCATCAGCAC AGTCCTGGCA GCCACTGACC TGGTTTCTGT CCCTACTGTT TTGCCTTTTC CAGAATGTCA TTTAAGTGAC
* * * * *
ATCATTCA TT ATGGAGACTT GTTTTATTTT TTATTTTTTA TTTTGTGAGA AGGAGTCTCG CTCTTGTTC CCAGGCTAGA
* * * * *
                                     >SmaI
                                     |
* * * * *
GTGCAATGCT GTGATTCGG CTCACTGCAA CCTCCGCTC CCGGGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTCAGCC TCCCGAGTAG
* * * * *
TTCGGGACCA CAGGCGTACA CCACCATGCC CAGCTAATTT TTTTTTTTTT TGAGATGGAG TCTCGCCCTG TCACCCAGGC
* * * * *
                                     >SmaI
                                     |
* * * * *
TAGAGTCCAG TGGCATGATC TGCCTCACT GCCAAGCTCC TGCCTCCCGG GTTTCAGCC ATTCCCCTGC CTCAGCCTCC
* * * * *
                                     >BamH1
                                     |
* * * * *
CGAGTATGCC CGGCTAATTT TTGTATTTT AGTAGAGACG GGGTTTCCCC ATGTTGGCCA GGCTAGTCTC AAACCTCTGA
```

5a. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi/Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Tel.: 34-24-950, Fax: 34-24-343



11/26

3360

* * * * *
 TGC GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC
 C G E P A L P S A S E E Q V A Q D T E E V F>

3440

* * * * *
 CGC AGC TAC GTT TTT TAC CAC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GCG GCT GCC CCT GCC GAC
 R S Y V F Y H H Q Q E Q E A E G A A A P A D>

>Nco1

|
3520

* * * * *
 CCA GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC
 P E M V T L P L Q P S S T M G Q V G R Q L A>

>Pst1

3600

* * * * *
 ATC ATT GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG
 I I G D D I N R R Y D S E F Q T M L Q H L Q>

>ScaI_

3680

* * * * *
 CCC ACG GCA GAG AAT GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC TCC AGC CTG TTT GAG AGT GGC ATC
 P T A E N A Y E Y F T K I A S S L F E S G I>

* * * * *
 AAT TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC AGC TAC CGT CTG GCC CTA CAC ATC TAC CAG CGT
 N W G R V V A L L G F S Y R L A L H I Y Q R>

3760

* * * * *
 GGC CTG ACT GGC TTC CTG GGC CAG GTG ACC CGC TTT GTG GTG GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT
 G L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I>

3840

* * * * *
 GCC CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG
 A R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L>

3920

* * * * *
 AAC GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA
 N V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S>

5e. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



12/26

```

                                     >Af12
                                     |
                                     4000
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGA CTC CCAAGGGTGC CCTTTGGGGT CCCAGTTCAG ACCCCTGCCT GGACTTAAGC GAAGTCTTTG CCTTCTCTGC
*>

                                     >Hind3
                                     |
                                     4080
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TCCTTGCAGG GGTCCCCCT CAAGAGTACA GAAGCTTTAG CAAGTGTGCA CTCCAGCTTC GGAGGGCCCC TGTGTGGGGG

                                     >Pst1
                                     |
                                     *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CCAGTCAGGC TGCAGAGGCA CCTCAACATT CCATGGTGCT AGTGGGCCCT CTCTCTGGGC CCAGGGGCTG TGGCGTCTCC

                                     >Nco1
                                     |
                                     *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TCCCTCAGCT CTCTGGGACC TCCTTAGCCC TGTCTGCTAG GCGCTGGGGA GACTGATAAC TTGGGGAGGC AAGAGACTGG

                                     >Apa1
                                     |
                                     4160
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GAGCCACTTC TCCCCAGAAA GTGTTAATG GTTTAGCTT TTTATAATAC CCTTGTGAGA GCCCATTCCC ACCATTCTAC

                                     >Aha2
                                     |
                                     4240
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TCCCTCAGCT CTCTGGGACC TCCTTAGCCC TGTCTGCTAG GCGCTGGGGA GACTGATAAC TTGGGGAGGC AAGAGACTGG

                                     >Aha2
                                     |
                                     4320
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GAGCCACTTC TCCCCAGAAA GTGTTAATG GTTTAGCTT TTTATAATAC CCTTGTGAGA GCCCATTCCC ACCATTCTAC

                                     >Aha2
                                     |
                                     4400
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CTGAGGCCAG GACGTCTGGG GTGTGGGGAT TGGTGTGTCT ATGTTCCCCA GGATTCAGCT ATTCTGGAAG ATCAGCACCC

                                     4480
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TAAGAGATGG GACTAGGACC TGAGCCTGGT CCTGGCCGTC CCTAAGCATG TGTCACAGGA GCAGGACCTA CTAGGAGAGG

                                     4560
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GGGGCCAAGG TCCTGCTCAA CTCTACCCCT GCTCCCATTC CTCCTCCGG CCATACTGCC TTTGCAGTTG GACTCTCAGG

                                     4640
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
GATTCTGGGC TTGGGGTGTG GGGTGGGGTG GAGTCGAGAC CAGAGCTGTC TGAAGTCTATG TGTCAGAAGC CCTCCAAGCC

                                     4720
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *
TGCCCTCCAG GGTCTCTCTCA GTTCTCTCCC TTCCTCTCTC CTTATAGACA CTTGCTCCCA ACCCATTAC TACAGGTGAA

```

5f. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
34-24-950, Fax: 34-24-323



13/26

>StuI

4800

* * * * *
GGCTCCTCAC CCCCATCCCT GGGCCTTGGG TGAGTAACCT GCTAAGGCCT CCTTGCCAG ACTACAGGGC TTAGGACTTG

4880

* * * * *
GTTTGTATT TCAGGGAAAA GGAGTAGGGA GTTCATCTGG AGGGTTCTAA GTGGGAGAAG GACTATCAAC ACCACTAGGA

>BamHI

4960

* * * * *
ATCCCAGAGG TGGGATCCTC CCTCATGGCT CTGGCACAGT GTAATCCAGG GGTGTAGATG GGGGAAGTGT GAATACTTGA

5040

* * * * *
ACTCTGTTCC CCCACCCTCC ATGCTCCTCA CCTGTCTAGG TCTCCTCAGG GTGGGGGGTG AGAGTGCCTT CTCTATTGGG

5120

* * * * *
CACAGCCTAG GGTCTTGGGG GTCGGGGGGA GAAGTCTTG ATTCAGCCAA ATGCAGGGAG GGGAGGCAGA TGGAGCCCAT

5200

* * * * *
AGGCCACCTC CTATCCTCTG AGTGTGGGA AATAAAGTGT GCAATCCCCT CAAAAAATA AAAATAAAAA AAATAAAAAAT

5280

* * * * *
AAAAAACAT TTTTTTCAAG CAGGGAGTGG TGGCTCCCGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GAGGCCAAGG CGTGCAGATT

5360

* * * * *
GCTTCAGTTC AGGAGTTCAA GACCAGCCTG GGAACATGG TGAAACCCCA TCTCTACTAA AAATAAAAAA TTAGCCAGGC

5440

* * * * *
ATAGTGTCGC GCACCTGTAC TCCCAGCTAT TTGGGAGGCT GAGGTAGGAG AATTGCTTGA ACCCAGGAGG TGGAGGTTGC

5520

* * * * *
AGTGAGCTGA GATCAGGCCA CTGCACTCCA ACGTAGGTGA CAGAGATAGC CTCCTTCTAA AAAACAACC TTTTTTCCAG

>XbaI

5600

* * * * *
CCAAAACAAC TGAACCTCCT CCCCACTGAC CACCTCAATT ATTTCTAGAT GCCTTGTTGC TGCCAGACT GCGGTGATTC

5680

* * * * *
CCTGGGCTGA TCTGAGCCCG TGGCCTGAGT CATTGTCAGT TCCTCTAGCA GGTGGTCCCC CATGTCATGG CCCCTGTGAA

5g. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az I.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323

14/26

```

                                                    >Hind3
                                                    |
                    5760
*           *           *           *           *           *
ACCAGTTCCT TACCATCTCT GTTCATCGCT GCTCCCTAAG TTAGGCCCTG CATGTCTTGA GGGTAGGTTA GATTCAGAAA

                    5840
*           *           *           *           *           *
AGCTTTGGTC GCATCACTGC TTTCATAAAC TCAAATGAGA GGGAGGGAGG GAAGGCAGGA AGAAGGGAGG GAGTCCTTTC

                    5920
*           *           *           *           *           *
TCTCCACAG TGTGCATTAC CTCATGTAAC ACTTCTTGCT AATGTGGTAG AATGTGTTG ACTTTGAATG AGACTTGGGT

                    6000
*           *           *           *           *           *
TTATTTTAT TTATTTATT ATTTATTTAT TTATTTATT TGAGATGGAG TTCACTCTT GTTGCCAGG CTGGAGTGT

                    6080
*           *           *           *           *           *
GTGGCAGGAT CTCTACTCAT TGCACCCTCC GCCTTCCAGG TTCAAACGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCA AGTAGCTGGG

>SphI
|
                    6160
*           *           *           *           *           *
ATTACAGGGG CATGCCACCA TGCCAGCTA ATTTTGTAT TTTTAGTAGG GACGGGGTTT CACCATGTTG ACCAGGCTGG

                    6240
*           *           *           *           *           *
TCTGGAAGTC CTGATCTCAG GTGATCCACC TGCTCGGCC TCCCAAAGTG TTGGGATTAC AGGCGTGAGC CACCGTGCCT

                    6320
*           *           *           *           *           *
GGCCTGAGAC TAAATCCAT CTCTTTTTTC TTCTTCTTTT TGAGACAGAG CCTCATTCTG TTCCCATGC TGGAGTTCAG

                    >BamI
                    |
                    6400
*           *           *           *           *           *
TGGCGTGATT TTGGCTCACT GCAACCTGG CCATCTGGGT TTGAGCAATT CTCGTGCCTC AGCCTCCTGA GTAGCTGGCA

                    6480
*           *           *           *           *           *
CTATAGTCAC ATGCCACCAC GCCCGGCTAA CTTTTTTGTA TTTTGTAGTAG AGACAGGGTT TCATATGTT AGCCAGGCTG

>EcoRI
|
GTCTCGAATT C
    
```

5h. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám
 szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 11.1067 Budapest, Andrássy út 113.
 +36-1-24-950, Fax: 34-24-323

cdn1 masqgpppprqqcgepalpsaseeqvaqdtteevfrsyvfyhrhqqeaegeaapaadpemt
 cdn2 masqgpppprqqcgepalpsaseeqvaqdtteevfrsyvfyHhqqeaegeAaapaadpemt
 bc12 mahagrtgyDNREIVMKYIHYKLSQRGYEwdagvgaappaapagi fssqpghtphtaasrdpvarstplqtpaapgaa
 bax mdsgeqprgggtsseqimktgalllqgfiqdragrmgeap
 bc1-x msqSNRELVDVFLSYKLSQKYSwsqfsdveenrteapegetesemetpsaingnpswhladspavngatghsssl
 mc1-1 ...(+123 aa)eldgyepeplgrpavpllelvgesGnntstdgslpstpppaeedeleyrqsleisrylreqatgakdtk
 A1 maeselmhhihslaehylqyvllq
 bhrf maystreillalcirdsrvhngtllhvpvlelaar
 LMW5-HL megeeliyhniineilvgv
 ced9 mtrctadnsltnpayrrrtmatgemkeflgikgteptdfginsdaqdlpspsrqastrmsigesidgkindweeprlDIEGFVVDYFTHRIRQNGMEWfgapg

cdn1 lplqpsstmgVGRQLAIGDDINRRYDSEFQTMQLQLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGI-NWGRVVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
 cdn2 lplqpsstmgVGRQLAIGDDINRRYDSEFQTMQLQLQPTAENAYEYFTKIASSLFESGI-NWGRVVALLGFSYRLALHIYQRGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
 bc12 agpalspvppVHLLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSRQLHltpftargRFATVVEELFRDGV-NWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTY-LNR
 bax elaldpvpqdstkklsecikrigdeldsnmelqrmiaavtdsprevFFRVAADMFSDFGNFNWGRVVALFYFASKLVKALCTKVPPELIRTIMGWTLDF-LRE
 bc1-x darevipma-AVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFQVWVWELFRDGV-NWGRIVAFFEFGGALCVESVDKEMQVLSRIAAMATY-LND
 mc1-1 pmgrsgatsrkaLETLLRVGDGVQRNHETVFGMLRKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDFGVTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKTIQESCIEPLAESITD-VLVR
 A1 vpa fesapsqacrvlqrvasfvqkeveknksylddfhvesidtarifNQVMEKEFEFEDIINWGRIVTIFAAGVLLKKLpqeqialdvcaaykvssfvaeafi
 bhrf etplrlspedtvvlyrhvleeiierisetftetwnrfithtehvdldfnsvfeifhd-LINWGRICGFIVFSARMAKYCKDANn-HLESTVITTTAYNF-SEG
 LMW5-HL ikyyimdihel spyqqqikkil tyydeclnkqv itfsltnaqeiktQFTGVVTELFKrgdpslgralawmawcmhacrtlccnqstpyyvvdlsvrgmleam-
 ced9 lpcgvqpehemmrvmgtifekkhafenfetfceqLlavprisfsl yqdvvrtvgnatdqcpMSYGRLLIGLISFGGFVAAKMmesvelqgqvrnl fvytslFIKT

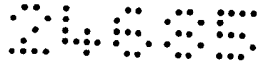
cdn1 CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvlgvllgqfvvrrffks
 cdn2 CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvlgvllgqfvvrrffks
 bc12 HLHT--WI--QDNGGWDAFVELYgpsmrlfdfswlskllslalvgacitlgaylghk
 bax RLLG--WI--QDQGGWDGLLSYFgtpwtqtvtifvagvltasltiwkmg
 bc1-x HLEP--WI--QENGGWDTFVELYgnaaaesrkqerfnrwlftgmtvagvllgslfsrk
 mc1-1 TKRD--WLVKQ--RGWDGFVEFFhvedleggirnvlafagvagvagalylir
 A1 MNNTGEWI-RQ-NGGWEdgfiikkfepksgwltflqmtgqiwmflfk
 bhrf -LDG--WIHQQ--GGWStliednpgsrrfswtflagltlslivicsylfisirgrh
 LMW5-HL KHNLLPMMISH--GGQEEFLAFslhsqiysvifnikyflskfchhfrscvqlrkcnlj
 ced9 -RIRNWKE-H-NRSWDDFMTLgkqmkedyeraeaeakvgrkrqrnwsmigagvtagaigivgvvvcgrmmfslk

ifj. Szentéteri Ádám
 szabadság ügyvivő
 az S.B.C. & K. Nemzetközi
 Szabadságmozgásért
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

Szekvencia azonosóság

cdn1/cdn2 = 97%

6. ábra





ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

```

>EcoRI
|
* * * * *
GAATTCTGGT AATTAGTTAA ACAACCTTGA ACAAGTTGTT TCACTTCTCT GAGTCTCAGT TTCTCACTCA AAAATGGTGA 80
* * * * *
ATAATTTGTA AGACTTCGCT AATAATCTAC GACTCTACAA GAGGCAATAG GGTACTGTGG ACAGAGAGCA GGCTTTGGAA 160
* * * * *
                                     >Hind3
                                     |
                                     >BclI
* * * * *
ACACACAAGA CTGGGTTTAG ATTCTGCAC TCCACCCAGT GTGTGACTTG GCCAAGCTTC TTCACTTCTC TAAACCCCA 240
* * * * *
                                     >AflII
                                     |
* * * * *
TCTGTGTATC TGTACAGGAA TGAATGAATG AGTATGTGCA GCCAAGCTAT GCAAACCTCA GGTTAAAATA TTGCCTGGG 320
* * * * *
                                     >AflII
                                     |
* * * * *
TTTTTTAGTA AATTGTTCAA GCCCATGACA TTCTAGCAGA AAAAGCCTAG TGTCTCTTTC TTAAGGTGAT TGTGTCCATG 400
* * * * *
* * * * *
TGTTTTCCAG GAACTCTATG GGTTTCTCAA CCCAAATTCA CCCTGCCCTT GACCAAATGG CTCACCAGCT TCACGGATGC 480
* * * * *
                                     >PstI
                                     |
                                     >PstI
* * * * *
TGCTCTGATG ACACACCCTG CAGTCAGCAT CTGCCCTGTC AGCTAGAATG GATTTCTGAG TGGGCATTAG CTGGGGGATA 560
* * * * *
                                     >BglII
                                     |
* * * * *
CCACATGGGC ACCAATGTCA CAGATCTTCT GTCACAGTCC ACCCCGAACC ATTGCTTCTC AAATCATAAT CCCTTAGCAG 640
* * * * *
                                     >SpeI
                                     |
* * * * *
GACAGCTAGG TGCAGCAGGC ATGACACAAA CACCAGCCCT TGCCTACAAT CTCAGCCACT ATCTTGAGTC TGAGCAACTA 720
* * * * *
* * * * *
GTCTAGTGGC AGCCGCGCCC TTCCTTTTCA AGAGAGTTCT GGGATCAGAT CCTTTCACAA ACAGATCCCT CCCACCCTG 800
* * * * *
* * * * *
CCTGTTGTCC AGGTCTGCAC ACTGAAAAGT AAGACAGCAT TTGCTAAGCC ATATTTCAAA AAGTTTGCTT ATACCTTCAT 880
* * * * *

```

7a. ábra



ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda Kft.
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

18/26

1680

* * * * *
CAA GGC CCA GGG CCT CCC AGG CAG GAG TGC GGA AAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG
Q G P G P P R Q E C G K P A L P S A S E E Q>

1760

* * * * *
GTA GCC CAG GAC ATG GAG GGG TTT TCC GCA GCT ACG TTT TTT ACC ACC ATC AGC AGG AAC AGG AGG
V A Q D M E G F S A A T F F T T I S R N R R>

>Not1

>Nco1

1840

* * * * *
CTG AAG GGG CGG CCG CCC CTG CCG ACC CAG AGA TGG TCA CCT TGC CCC TCC AAC CTA GCA GCA CCA
L K G R P P L P T Q R W S P C P S N L A A P>

1920

* * * * *
TGG GGC AGG TGG GAC GGC AGC TCG CCA TCA CCA GGA CGA CAT CAA CCG GCA CTA TGA CTTCGGAGT
W G R W D G S S P S P G R H Q P A L *>

>Pst1

>Pst1

>Sca1_

2000

* * * * *
TCCAGACCAT GCTGCAGCAC CTGCAGCCCA CGGCAGAGAA CGCCTACGAG TACTTCACCA AGATCGCCTC CAGCCTGTTT

2080

* * * * *
GAGAGTGGCA TCAACCGGGG CCGTGTGGTG GCTCTCCTGG GCTTCGGCTA CCGTCTGGTC CTACATGTCT ACCAGCACGG

2160

* * * * *
CTTGACTGGC TTCCTGGGCC TGGTGACCCG CTTCGTGGTC TTCATGCTGC AACAAGGCAT CGCCCGGTGG ATCTGCAGA

2240

* * * * *
GGGGCGGCTG GGTGGCAGCC CTGGACTTGG GCAATAGTCC CATCCTGAAC GTGCTGGTGG TTGTGGGTGT GGTTCCTGCTG

>Pvu2

2320

* * * * *
GGCCAGTTTG TGTAAGAAG ATTCTTCAA TCATGACTCC CAGGGGTGTC CTTTGGGGTC CCAGCTGTGA CCCCTGCCTG

>Af12

2400

* * * * *
GACTTAAGCC AAGTCTTTGC CTCCCCACT CCCTGCAGG GGTCACCCTT CAAAAGTACA GAAGCTCTAG CAAGTGTGCA


```

                                     3440
      *           *           *           *           *
CAGTGTGGGG GTGAGAGTAC CTTCTCTATC GGGCACAGCC TAGGGTGTG GGGGTGAAGG GGGAGAAGTT CTTGATTGAG

                                     3520
      *           *           *           *           *
CCAAATGCAG GGAGGGGAGG CAGAAGGAGC CCACAGGCCA CTCCTATCC TCTGAGTGTG TGGAAATAAA CTGTGCAATC

                                     3600
      *           *           *           *           *
CCATCAAAAA AAAAAAGGAG AAAAAAATGT AAAAAACATT CTTAGCTGTA AGCTACTTAT AGGGGGATAA AGACAGGACT

                                     3680
      *           *           *           *           *
GTTAATGGAC ACAAACATAC AGTTAGAGAG AAGAAATAAG TTCTGTCCAG GCACGGTGGC TCACACCTCT AACTCCAGCA

                                     >Bg12
                                     |
                                     *
                                     3760
      *           *           *           *           *
CTTTGGGAGA CCAAAGTGGG AAGATCATTT GAGTCCAGGA GTTCGAGACC AGCCTGGACA ACATAGCAAG ATCTTATCTC

      >Dra1
      |
      >Aha3
      |
      *           *           *           *           *           *
TACAGAAAAT TTAAAAAAA GAAAAAACT AGCCGCACAG GTCTGCAGTC CTAGCTACTC GGGAGGCTAA GGTGGGAGAA

                                     3840
      *           *           *           *           *
TACAGAAAAT TTAAAAAAA GAAAAAACT AGCCGCACAG GTCTGCAGTC CTAGCTACTC GGGAGGCTAA GGTGGGAGAA

                                     3920
      *           *           *           *           *
TCCTTGAACC CAGGGATTTA GTTTGAGGTT GCAGTGAGCT ATGATTGCAC CACTGCACTC CAGACTGGGT GACTGAGTGA

                                     4000
      *           *           *           *           *
GACCCTGTCT CAAATATAAA GAAGGAACAA GTTCTAGTTT TCAATAGCGC AATAGGGTGA GTGCAGTTAG CAACAACATA

                                     4080
      *           *           *           *           *
TTGTGTATTT CAAAATAGCT ACAAGAGAGG ATATGAAGTG TTCCCCAAA CAAGGAATGA TAACGTTGGA GGTGACAGAT

                                     4160
      *           *           *           *           *
ACCTTAAATA CCCTGATTTG ATCATTACAC ATTCAATGTA TGTATCAAAA TATTACATGT ACCCCACAAA TTTGTGTAAA

      >Dra1
      |
      >Aha3
      |
      *           *           *           *           *
TATTATGTAT CCACTTTTTA AAGTTGGCAG AGCCAAAAG CACTACTATG GCTTCCAGTG GTCAGTGTGA GCACTGCCAG
  
```



ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzeti
Szabadalmi Irodájában
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
t.: 34-24-950, Fax: 34-24-323

```

* * * * *
CTCAGCAAAT GTATCACCCA AAATCTGGGC AATGTGGGAA ATTGGCTTCA TGGCAGCTAT GGCTTTGCCA CTGATAGGAA
4320
>BclI
|
* * * * *
TGATTTCCAG AGATACTTAA TCCTCAATTC GGGACTCTTT GCTTCAGGAG TTTGGCTGGC CAGGAACATG AGTGACAGTG
4400
|
* * * * *
ACCTCTTGGC ACTTCAGCTG GGGGTGTAGC CAAGCAGACA AATGGAATCT TGTGCTGAAC CCAAACCTTC TAGAAACAGA
4480
|
* * * * *
GCCTGTGAGC ATCACAAGAT ATGCCCTGAT GGAAGCTGAA GTTAAATTC GCTGAGCGCT TGCCCCTTTC CAACCTGGTT
4560
|
* * * * *
TCTTTTGTGTT CCTTGAGTCC AGTCAGAATG CCATTCCCTG GCCAGCAGCC AGCCTTTAGT GACTGTCTCT GTTCTGCAAA
4640
|
* * * * *
GCTCTGTATA TAGTACTGA GTTTCTGCAG GGGGTGATCT TTGCTCTTGT CCTAAGAAAT AACTACAGTG TTTAAGAAA
4720
|
* * * * *
TATTTGAGGC CGGGTGCAGT GGTTACACCC TGTAATCCAG CACTTTGGGA GGCCAAGGCA GGTGGATCAT GAGGTCAAGA
4800
|
* * * * *
GTTTGAGACC ATCATGGCCA ACATGGTGAA ACCCATCTC TACTAAAAAT AAAAAATTA GCTGGGTGTG GTGGCGGGCA
4880
|
* * * * *
CCTGTAGTCC CAGCTACTCG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAGCC TGGGAGGCGG AGGTTGCACT GAGCCGATAT
4960
|
* * * * *

```



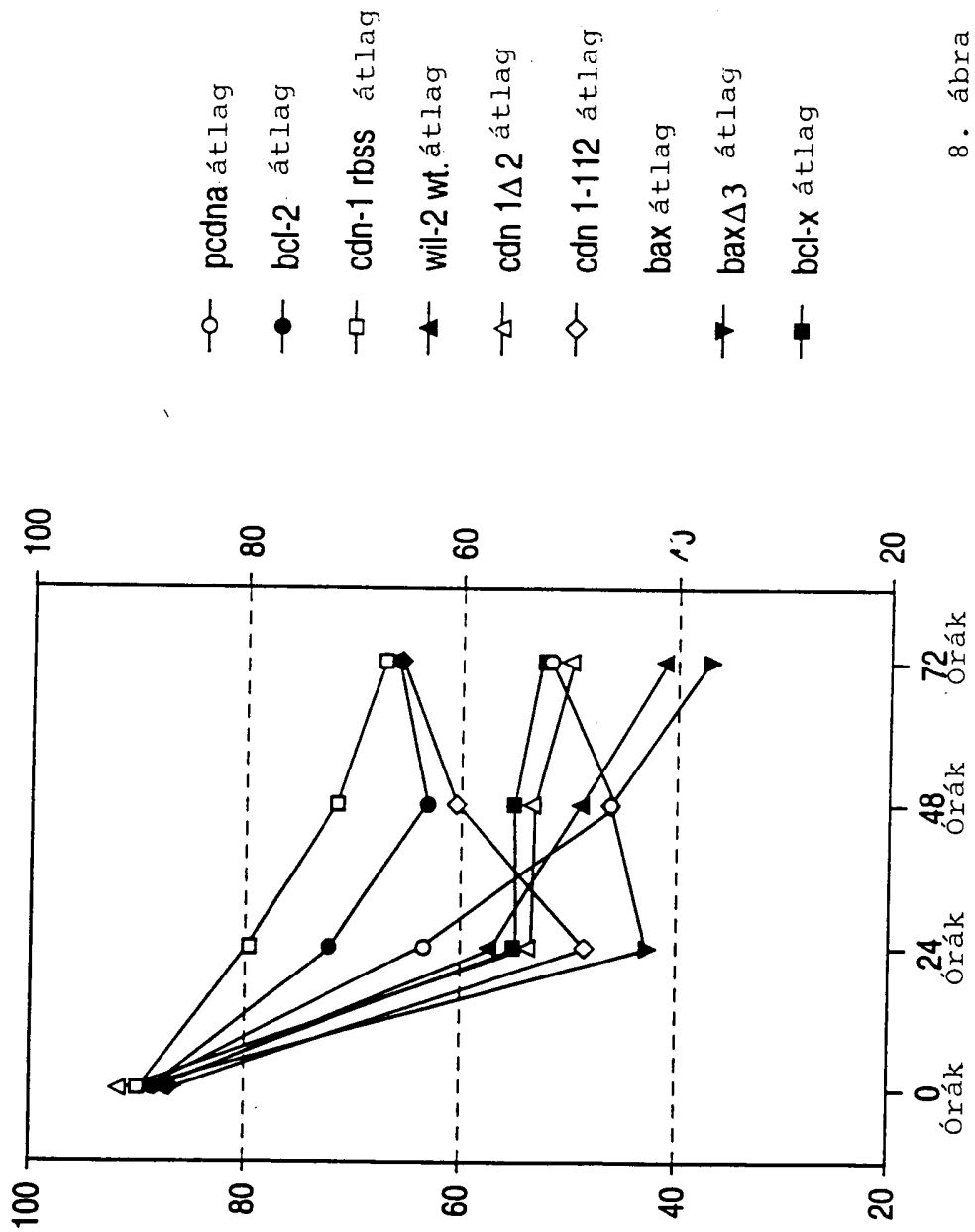
```

* * * * *
5040
* * * * *
CACGCCACTG CACTCCAGCC TGGCGACAGA GCGAGACTCC ATCTCAAAAA AAAGAAAAAA TAAATAGTTG AAATAAAGAC
* * * * *
* * * * *
5120
* * * * *
TGCACATAAA GACAAAAAAA AAGTTTATAA AGTTAAAAAA TAAAATAAAA AACAGGCTCC AGGCTGGATT GGGCCCAGAG
* * * * *
* * * * *
5200
* * * * *
GCTGTAGGAC ACAGACCCCC AGCCAATGAC TTCATAAATC CGGATGTTAA TCAGCCTCAC CTGGGAATTT GGGGAGGGGA
* * * * *
* * * * *
5280
* * * * *
CTCATTTTAA AACAGTTTCC TGGATTCTAA CCCAACCAG AAAATCAGAC TCTTTGAGCT AAATTCTTAA GCTCCCTGGT
* * * * *
* * * * *
5360
* * * * *
GATGATGATG GAACCAAGTTT ATGGCTGACC CCAGAGTACC GTCTGAAAGA CGTGCCACAT CCCTCTCTCT CCAGCCTCCC
* * * * *
* * * * *
5440
* * * * *
CTTCTCCTCC ATTCCCCAGG GAGAATTC
* * * * *

```

7g. ábra

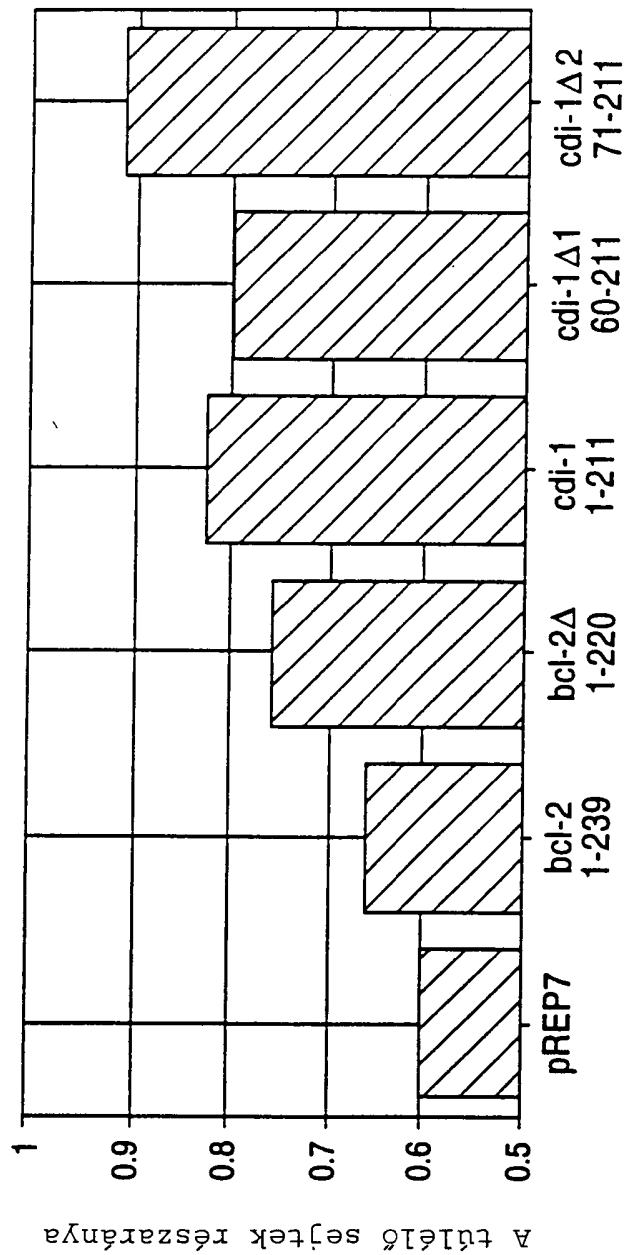
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Tel: 34-24-950, Fax: 34-24-323



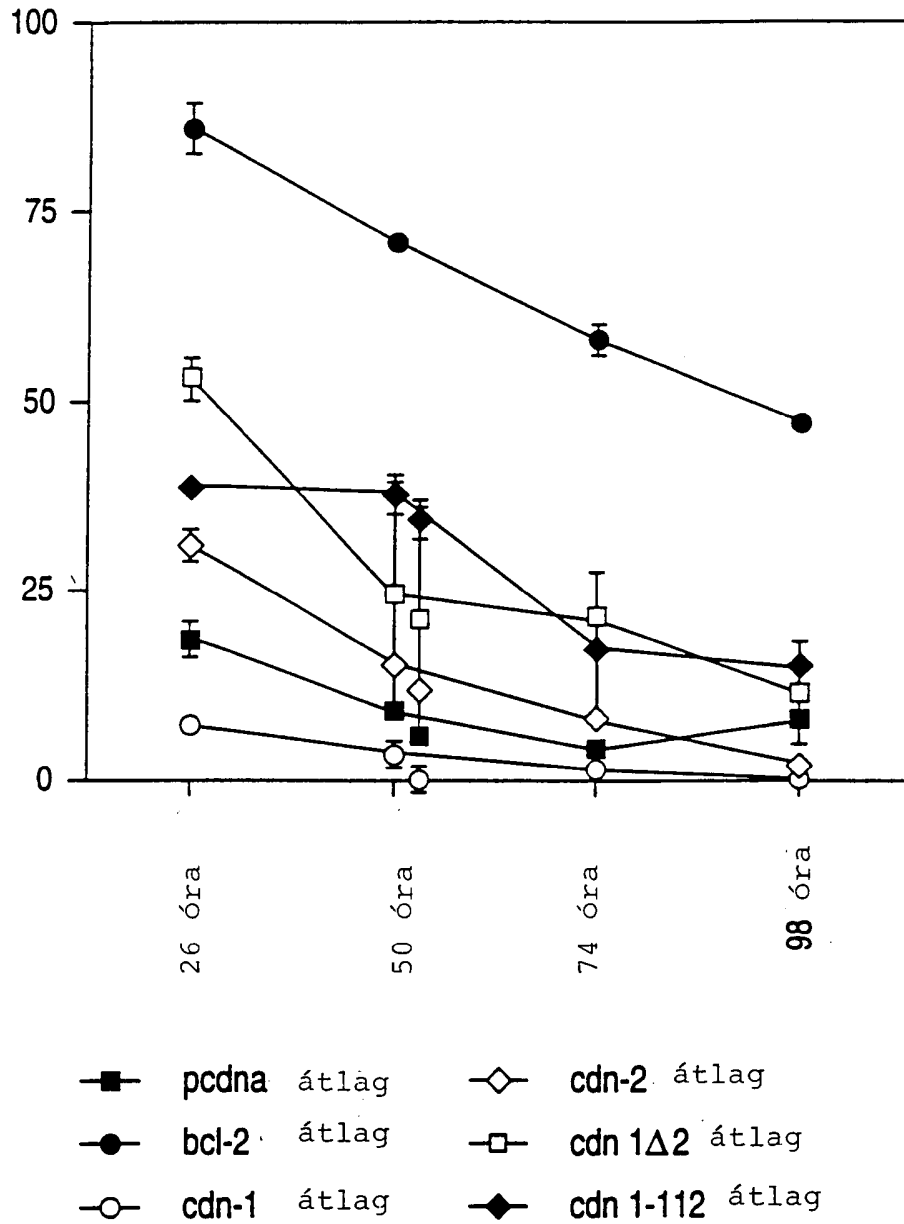
8. ábra

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
 Tel.: 34-24-950, Fax: 34-24-323



9. ábra



10. ábra

Ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.C. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

MASGQGGPPRQECGEPALPSASEEQVAQDTEEVFRSYV FYRHQQEQEAEGVAAPADPEMVT $\Delta 1$
 \longrightarrow
 $\Delta 2$ $\Delta 3$
 \longrightarrow \longrightarrow
 LPLQPSSTMGQVGRQLAII GDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGNWGR
 VVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHHC IARWIAQRGGWVAALNLGN GPI LN
 VLVVLGVVLLGQFVRRFFKS

11. ábra