

KIVONAT**Új dezintegrin metalloproteáz, mutánsai, fragmentumai és
hasonlók alkalmazása**

A találmány a dezintegrin proteinekhez kötődni képes vegyületek azonosítására, valamint egy mintában egy dezintegrin proteinekhez kötődni képes vegyület mennyiségének az affinitásnak meghatározására szolgáló eljárásra vonatkozik. A találmány egy olyan gazdasejtre is vonatkozik, amely dezintegrin proteinekre alkalmazható rekombináns expressziós vektort tartalmaz. Vonatkozik továbbá egy dezintegrin proteint kódoló rekombináns expressziós vektorra, a humán dezintegrin metalloproteázra, ennek ilyen célokra használható fragmentumára vagy mutánsára. A találmány tárgya ezenkívül egy in vivo vagy in vitro eljárás osteoarthritis és más, metalloproteázon alapuló betegség szűrésére.



2006.03.19.



PO 100780

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-823

68.663/BE

Új dezintegrin metalloproteáz, mutánsai, fragmentumai és hasonlók alkalmazása

A találmány egy új proteinre, fragmentumaira és mutánsaira vonatkozik, valamint olyan bántalmak — beleértve az osteoartritist és másokat — kezelésére szolgáló gyógyászati szerek kimutatására és vizsgálatára, amelyeket a metalloproteázok hatásának felerősödése jellemez.

Számos szerkezetileg rokon metalloproteáz enzim vesz részt a sturúrális proteinek lebontásában. Ilyen a humán bőr fibroblaszt kollagenáz, a humán bőr fibroblaszt zselatináz, a humán köpet kollegenáz és zselatináz és a humán stromalizin. Lásd: S.E. Whitam et al., [Biochem.J., 240, 913 (1986)]; G.J. Goldberg et al.; [J.Biochem., 261, 660 (1986)]. Ezen szerkezetileg rokon enzimek, amelyek „metalloproteáz” néven ismertek, közös tulajdonsága a fém-függőség (például: cink).

Ezeknek az enzimeknek a szabályozott termelődése és aktivitása fontos szerepet játszik a szöveti szerkezet normál kialakulásában. Amennyiben azonban, ezek az enzimek feleslegben vannak, a kötőszövetek kóros leépülését okozhatják. Lásd általánosságban: J.Saus et al.; [J.Biol. Chem., 263, 6742 (1988)]. Ezen enzimek közül többen cink-tartalmú metalloproteáz enzimek, ilyen az angiotenzin-konvertáló enzimek és az enkefalinázok. A kollagenáz, stromelizin és a rokon enzimek fontos közvetítő szerepet töltenek be több betegség kórtünetében. Ilyen például a reumatoid arthritis [D.E.Mullins et al., Biochem.Biophys.Acta, 695, 117-214 (1983)], az osteoarthritis [B.Henderson et. al.,



Drugs of the Future, 15, 495-508 (1990)], a tumor sejtek metasztázisa [ugyanott; M.J. Broadhurst et al., 276 436 számú európai szabadalmi bejelentés (közzétéve 1987-ben); R.Reich et al., Cancer Res., 48, 3307-3312 (1988)] és a különböző elfekélyesedő állapotok. Az elfekélyesedett állapotok szarusodást okozhatnak, alkáli eredetű égések eredményeként vagy Pseudomonas aeruginosa, Acanthamoeba, Herpes simplex és vacciniavírus fertőzés következményeként.

Rákos szövetben a metalloproteáz méréséből valóban arra lehet következtetni, hogy a metalloproteázok megnövekedett szintje a metasztatikus potenciállal van korrelációban. [Lásd például M.J. Duffy et al.; Br.J.Cancer, 71, 1025 (1995)].

Nem-kívánt metalloproteáz aktivitással jellemezhető további állapotok közé tartozik például a periodontális betegség (periodontium = foggyökér csonthártya), az epidermolysis bullosa (felhám hólyagos leválása) és a scleritis (inhártyagyulladás). Tekintettel arra, hogy a metalloproteázok számos betegségben megtalálhatók, megkísérelték az inhibitorok előállítását ezek ellen az enzimek ellen. A szakirodalom több ilyen inhibitorról számolt be. A találmány arra törekszik, hogy olyan új inhibitorokat — előnyösen olyanokat, amelyek specifikusak ezekre a proteázokra — biztosítson, amelyeknek fokozott a hatása az ezen proteázok által közvetített és modulált betegségek kezelésében.

Metalloproteáz inhibitorok használhatók olyan betegségek kezelésében, amelyeket — legalább részben — a struktúrális proteinek lebomlása okoz. Számos különböző inhibitort állítottak elő eddig, de folyamatos az igény metalloproteáz inhibitor szű-



rések iránt, az ilyen betegségek kezeléséhez való gyógyászati szerek kidolgozása céljából.

Mivel adott a mátrix metalloproteázok részvétele számos betegséggel kapcsolatos állapotban, megkísérelték azonosítani ezen enzimek inhibitorait (mátrix = sejtközti állomány). Például a TapI-2 és az 1,10-fenantrolin ismert metalloproteáz inhibitorok. [Lásd például: J.Arribas et al.; J.Biol.Chem., 271, 11376 (1996)].

A metalloproteázok a proteinek egy széles terjedelmű osztályát alkotják, rendkívül változatos funkciókkal. A dezintegrinek cink metalloproteázok, bőségben fordulnak elő kígyóméregben. Az emlős dezintegrineket magába foglaló protein család körülbelül 18 alcsoportot tartalmaz. Működésük kiterjed a sejt-adhézió megtörésére és tudjuk, hogy a reprodukcióban is aktív szerepet játszanak (például: a petesejt sperma általi megtermékenyítésében, beleértve ezek fúzióját és a sperma érésében).

Ezeket és sok más proteázt is feltárt a molekuláris biológia és biokémia. Ennek eredményeként a GenBank-ban — amely génszekvenciák gyűjteménye — számos metalloproteáz szekvencia áll rendelkezésre, amelyek közül néhány szekvencia dezintegrin fragmentumokat kódol. Például: a Z48444 GenBank jegyzékszám (1994. febr. 25.) alatt egy patkány gén 2407 nukleotidja található, amelyek valószínűleg egy patkány dezintegrin metalloproteáz gént képviselnek; a Z48579 GenBank jegyzékszám (1995. márc. 2.) alatt egy gén 1824 nukleotidból álló rész-szekvenciája található, amely valószínűleg egy humán dezintegrin metalloproteáz génnek felel meg; a Z21961 GenBank



jegyzékszám (1994. okt. 25.) alatt egy gén 2397 nukleotidból álló rész-szekvenciája található, amely valószínűleg egy bovin cinkmetalloproteáz génnek felel meg.

Minthogy a metalloproteázok ilyen széles változata áll rendelkezésre, állandó igény van (i) olyan módszerekre, amelyek specifikusan tudnak kimutatni egy-egy metalloproteázt, továbbá (ii) inhibitor jelöltek azonosítására szolgáló módszerekre.

Előnyös lenne, ha a metalloproteázokat speciális betegségi állapotokhoz lehetne rendelni és ezeket a metalloproteázokat eszközként lehetne használni ezen betegségek kimutatására és végeredményben ezek gyógyítására, ellenőrzésére és a gyógykezelések megtervezésére.

A találmány tárgyát egy olyan eljárás ismertetése képezi, amely a dezintegrin proteinhoz kötődni képes vegyületek azonosítására alkalmas.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezi egy olyan gazdasejt, amely rekombináns expressziós vektort tartalmaz a dezintegrin protein számára és egy olyan rekombináns expressziós vektor, amely a dezintegrin proteint kódolja.

A találmány továbbá olyan eljárást bocsát rendelkezésre, amely metalloproteáz által közvetített betegségek — például rák, ízületi betegségek (beleértve az ankylosis spondylitist, reumatoid arthritist, köszvényes arthritist (köszvény), gyulladásos arthritist, Lyme kórt és osteoarthritis — szűrésére szolgál.

A találmány tárgyát képezi a protein elleni antitest is, amely a szűréshez, a protein izolálásához vagy a proteinre spe-



cifikus reagensként alkalmazható.

A találmány egy olyan eljárásra vonatkozik, amely a dezintegrin proteinekhez kötődni képes vegyületek azonosítására és egy mintában egy dezintegrin proteinekhez kötődni képes vegyület mennyiségének és affinitásának meghatározására alkalmas.

A találmány vonatkozik ezenkívül egy olyan gazdasejtre, amely rekombináns expressziós vektort tartalmaz a dezintegrin proteinek számára, egy rekombináns expressziós vektorra, amely a dezintegrin proteint kódolja, és a humán dezintegrin metalloproteáz proteinek, ennek olyan fragmentumára vagy mutánsára, amely ilyen célokra használható.

A találmány vonatkozik még egy *in vivo* vagy *in vitro* eljárásra, amely az osteoarthritis és más metalloproteázon alapuló betegségek — például a rák — szűrésére alkalmas. Az eljáráshoz készlet (kit) gyártható, amely ilyen formában a szűréshez alkalmazható.

A "gén" kifejezés egy olyan DNS szekvenciára utal, amely egy érett proteinek vagy prekurzorának előállításához a szükséges szabályozó és kódoló szekvenciákat tartalmazza. A proteinek vagy teljes hosszúságú kódoló szekvencia kódolhatja, vagy pedig a kódoló szekvenciának egy olyan hosszúságú darabja, amely a kívánt enzimaktivitást megtartotta.

Az "oligonukleotid" kifejezés — ahogyan itt használjuk — egy olyan molekulát jelent, amely két vagy több dezoxiribonukleotidból vagy ribonukleotidból áll, rendszerint több, mint három (3), általában több, mint tízből (10), egész százig (100), vagy több, mint százból (ámbar előnyösen húsz és harminc



között). A megfelelő méret több faktortól függ, amelyek viszont az oligonukleotid végleges funkciójától vagy használatától függenek. Az oligonukleotid bármilyen módon létrehozható, beleértve a kémiai szintézist, DNS replikációt, restriktív endonukleázos emésztést, reverz transzkripciót vagy ezek kombinációját.

Mint ahogy a mononukleotidokat oligonukleotidok előállításához úgy reagáltatják, hogy egy mononukleotid pentóz gyűrűjének 5'-foszfát csoportja a vele egyirányban lévő szomszédjának 3'-oxigénjéhez kapcsolódjon foszfodiészter kötéssel, egy oligonukleotid egyik végét "5'-vég"-nek nevezik, ha 5'-foszfátja nem kapcsolódik egy mononukleotid pentóz gyűrű 3'-oxigénjéhez és "3'-vég"-nek, ha 3'-oxigénje nem kapcsolódik a következő mononukleotid pentóz gyűrűjének 5'-foszfátjához. Mondhatjuk tehát, hogy egy nukleinsav szekvenciának, még ha ez egy nagyobb oligonukleotid belsejéből való is, 5'- és 3'-vége van.

Ha két különböző, nem egymást fedő nukleotidot ugyanazon lineáris komplementer nukleinsavszekvencia különböző régióihoz illesztünk (anellálunk) és az egyik nukleotid 3'-vége a másik 5'-vége felé mutat, akkor az előbbit 5' irányban ("upstream") elhelyezkedő oligonukleotidnak mondjuk és az utóbbit 3' irányban ("downstream") lévő nukleotidnak hívjuk.

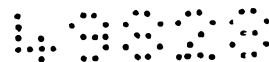
A "primer" kifejezés egy olyan oligonukleotidra vonatkozik, amely képes arra, hogy mint szintézis-indító pont működjék, amennyiben olyan körülmények közé helyezik, amelyekben a primer meghosszabbodása (extenziója) megindul. Oligonukleotid "primer" a természetben is előfordulhat, mint egy tisztított, restriktív enzimmel emésztett elegyben, de szintetikusán is előállítható.



A primert úgy választjuk meg, hogy "lényegében" komplementer legyen a templát specifikus szekvenciájának egy szálával. A primernek elégséges komplementaritást kell felmutatnia ahhoz, hogy egy templát szállal hibridizáljon és hogy a primer extenziója megtörténjék. Nem szükséges, hogy a primer szekvencia a templát pontos szekvenciáját tükrözze. Például: egy nem komplementer nukleotid fragmentumot hozzákapcsolhatunk a primer 5'-végéhez, amennyiben a primer szekvencia maradék része lényegében komplementer a szállal. A primer meg lehet tűzdelve nem komplementer bázisokkal vagy hosszabb szekvenciákkal, feltéve, ha a primer szekvenciának elégséges a komplementaritása a templát szekvenciával ahhoz, hogy hibridizáljon és ezáltal létrejöjjön egy templát - primer komplex a primer extenziós termékének a szintéziséhez.

A "hibridizációs" eljárásokban egy komplementer szekvenciát a cél nukleinsavhoz (a kimutatandó szekvenciához) anellálunk. Komplementer szekvenciákat tartalmazó két nukleinsav polimernek az a képessége, hogy egymást megtalálják és hogy bázispárosodással járó kölcsönhatás révén egymáshoz illesztődjenek, egy jól ismert jelenség.

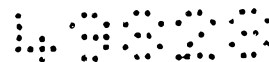
A "hibridizációs" folyamat első megfigyeléseit [Marmur and Lane, Proc.Natl.Acad.Sci., 46, 453 (1960); Doty et al., Proc.Natl.Acad.Sci., 46, 461 (1960)] ennek a folyamatnak a tökéletesítése követte, és ezáltal a modern biológiai esszenciális eszközévé vált. Mindazonáltal számos probléma akadályozta a hibridizációnak, mint eszköznek a humán diagnosztikában való széles skálájú alkalmazását. A nagyobb problémák közül megemlíthető (1)



a hibridizáció elégtelensége; (2) egy genomiális DNS keverékben a specifikus célszekvenciák alacsony koncentrációja; és (3) a csak részben komplementer szondák és célszekvenciák hibridizációja.

Ami az elégtelenséget illeti, kísérletileg megfigyelték, hogy egy hibridizációs reakcióban a szonda - célszekvencia komplexek lehetséges számának csak egy töredéke képződik. Ez különösen igaz rövid oligonukleotid szondák (100 bázis hosszúságnál kisebb szondák) esetére. Ennek három alapvető oka van: a) a hibridizáció nem tud létrejönni a másodlagos és harmadlagos struktúrák kölcsönhatása következtében; b) a célszekvenciákat tartalmazó DNS szálak komplementer szálukkal rehibridizálnak (reanellálnak); és c) néhány célmolekulát megakadályoz a hibridizációban az, ha olyan hibridizációs formátumokban kerülnek alkalmazásra, amelyekben a cél-nukleinsavakat szilárd felületen immobilizálták.

Még ha egy szonda szekvenciája teljesen komplementer is a cél-szekvenciával, azaz a cél-szekvencia primer szerkezetével, a cél-szekvenciát hozzáférhetővé kell tenni a szonda számára, magasabb rendű szerkezeti átrendezéssel. A magasabb rendű szerkezeti átrendezés a molekulának akár a másodlagos szerkezetét, akár a harmadlagos szerkezetét érintheti. A másodlagos szerkezetet az intramolekuláris kötések határozzák meg. A DNS vagy RNS cél-szekvenciák esetében ez egyetlen, bázisokból álló folyamatos szálon belüli hibridizációból áll (ellentétben két különböző szál közötti hibridizációval). Az intramolekuláris kötések számától és helyzetétől függően a szonda elmozdítható a cél-



szekvenciától a hibridizáció megakadályozására.

Oligonukleotid szondák oldatban való hibridizációját denaturált kétszálú DNS-hez, tovább bonyolítja az a tény, hogy a hosszabb komplementer cél-szálak denaturálódhatnak vagy újból anellálódhatnak. E folyamat által a hibridizált szonda is elmozdul. A szonda- és cél-szekvenciák kezdeti koncentrációihoz viszonyítva ez alacsony hibridizációs kihozatalt (alacsony "fedettség"-et; low "coverage") eredményez.

Ami az alacsony cél-szekvencia koncentrációt illeti, a célszekvenciát tartalmazó DNS fragmentum rendszerint viszonylag kis mennyiségben van jelen a genomiális DNS-ben. Ez komoly technikai nehézségeket jelent: a legtöbb olyan hagyományos módszer, amelyekben oligonukleotid szondákat használnak, nélkülözi azt az érzékenységet, amely az ilyen alacsony szintek melletti hibridizáció észleléséhez szükséges.

A cél-szekvencia koncentráció problémájának a megoldására megkísérelték megsokszorozni a detekciós szignált. A leggyakrabban ez azzal jár, hogy egy vagy több jelet visznek az oligonukleotid szondára. A nem radioaktív jelek esetében még a legmagasabb affinitású reagenseket is alkalmatlannak találták arra, hogy a genomiális DNS-ben egyetlen génmásolatot oligonukleotid szondákkal mutassanak ki [Lásd: Wallace et al., *Biochimie*, 6, 755 (1985)]. Radioaktív oligonukleotid szondák esetén úgy találták, hogy csak rendkívülien magas specifikus aktivitások mutattak kielégítő eredményeket. [Lásd: Studencki and Wallace, *DNA*, 3, 1 (1984); Studencki et al., *Human Genetics*, 37, 42 (1985)].

K.B.Mullis és munkatársai a 4,683,195 és 4,683,222 számú



amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban — a két szabadalmi iratot referenciának tekintjük — módszert ismertettek egy célszekvencia-szegmentum koncentrációjának bármilyen DNS keverékben való növelésére, klónozás vagy tisztítás nélkül. A célszekvencia sokszorozására szolgáló eljárás (amely a jelen találmánnyal kapcsolatban alkalmazható a célmolekulák előállítására) abból áll, hogy a kívánt célszekvenciát tartalmazó DNS keverékbe két oligonukleotid primert visznek be nagy feleslegben, ezután pontos sorrendben hőcirkuláltatás következik egy DNS polimeráz jelenlétében. A két primer komplementer a kettősszalú célszekvencia nekik megfelelő szálaival. A sokszorozás úgy történik, hogy a keveréket denaturálják és ezután hagyják, hogy a primerek a célmolekulán belüli komplementer szekvenciákkal anelláljanak. Az anelláció után a polimereket polimeráz alkalmazásával meghosszabbítják úgy, hogy egy új komplementer szál-pár keletkezik. A denaturálás, primer anellálás és primer meghosszabbítás (extenzió) sokszor megismételhető (azaz a denaturálás, anellálás és meghosszabbítás egy "ciklust" alkot és több ciklus végezhető), hogy a kívánt célszekvencia egy sokszorozott szegmentumát nagy koncentrációban kapjuk meg. A kívánt célszekvencia sokszorozott szegmentumának hosszát a primerek egymáshoz viszonyított relatív helyzete határozza meg és ezért ez a hosszúság egy szabályozható paraméter. Az eljárás ismételt jellege alapján a feltalálók a módszert "polimeráz láncreakció"-nak (Polymerase Chain Reaction = PCR) nevezték (a továbbiakban PCR). Minthogy a keverékben a célszekvencia kívánt sokszorozott szegmentumai lesznek a túlsúlyban lévő szekvenciák (koncentrációban kifejez-



ve), ezekről azt mondjuk, hogy "PCR-rel sokszorozott" szekvenciák.

PCR-rel lehetőségessé vált egy genomiális DNS-ben lévő specifikus célszekvencia egyetlen másolatának számos különböző metodikával (például: hibridizálás jelzett szondával, biotinezett primer beépítése után avidin - enzim konjugátummal való kimutató, ^{32}P -jelzett dezoxinukleotid-trifoszfátok — például dCTP vagy dATP — beépítése a sokszorozott szegmentumba) kimutatható szintig való sokszorozása. A genomiális DNS-en kívül bármely oligonukleotid szekvencia sokszorozható a megfelelő primer molekulákból álló készlettel. Nevezetesen, magával a PCR eljárással előállított sokszorozott szegmentumok alkotják saját hatékony templátjaikat a további PCR sokszorozásokhoz.

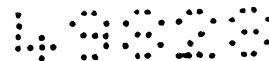
A PCR sokszorozási eljárásról tudjuk, hogy a specifikus célszekvencia egy körülbelül 10^{-8} M-nyi plató koncentrációt ér el. A szokásos reakciótérfogat 100 μl , amely 6×10^{11} kettős számlú termék-molekula kihozatalnak felel meg.

Ami a komplementaritást illeti, néhány diagnosztikai alkalmazáshoz fontos meghatározni, hogy a hibridizáció vajon teljes vagy részleges komplementaritást jelent-e. Például: ahol egyszerűen csak patogén DNS vagy RNS (ilyenek a vírus, baktérium, gomba, mycoplasma, protozoon eredetűek) jelenlétét kívánjuk kimutatni, akkor csak az a fontos, hogy amennyiben a szóbanforgó szekvencia jelen van, a hibridizációs módszer biztosítsa a hibridizációt; olyan feltételek is választhatók, amelyek mellett mind a részlegesen komplementer szondák, mind a teljesen komplementer szondák hibridizálnak. Más diagnosztikai alkalmazásoknál



azonban szükséges lehet, hogy a hibridizációs módszer megkülönböztesse a részleges és teljes komplementaritást. Ez a genetikai polimorfizmus kimutatásánál lehet lényeges. Például: a humán hemoglobin részben négy polipeptid láncból áll. E láncok közül kettő, 141 aminosavból álló két azonos lánc (alfa láncok) és a másik kettő 146 aminosavból álló két azonos lánc (béta láncok). Ismert, hogy a béta láncot kódoló gén polimorfizmust mutat. A normál allél olyan béta láncot kódol, amelyben glutaminsav van a 6. pozícióban. A mutáns allél olyan béta láncot kódol, amely valint tartalmaz a 6. pozícióban. Az aminosav különbségnek súlyos (a legsúlyosabb, amikor az egyén homozigóta a mutáns allélra) fiziológiai következménye van, amely klinikailag sárlósejtes anémia néven ismert. Jól ismert, hogy az aminosav csere genetikai bázisát a normál allél DNS szekvencia és a mutáns allél DNS szekvencia között egyetlen bázis különbsége teremti meg.

Hacsak nem kombinálják más technikákkal (ilyen a restriktív enzim analízis), azok a módszerek, amelyek azonos szintű hibridizációt tesznek lehetővé mind a részleges, mind a teljes komplementaritás esetében, általában nem felelnek meg ilyen alkalmazásokra; a szonda mind a normál, mind a variáns célszekvenciával fog hibridizálni. A hibridizáció létrejöttéhez, tekintet nélkül a használt módszerre, bizonyos fokú komplementaritásnak kell lennie a vizsgálandó szekvencia (a célszekvencia) és a vizsgálat kiviteléhez használt DNS fragmentum (szonda) között. (Természetesen kaphatunk kötődést mindennemű komplementaritás nélkül is, de ez a kötődés aspecifikus és elkerülendő.)



Egy nukleinsavszekvenciához való komplementer rész — ahogy itt használjuk — egy olyan oligonukleotidnak felel meg, amely, ha a nukleinsavszekvenciához úgy igazítjuk, hogy az egyik szekvencia 5'-vége a másik 3'-végével párosodjon, "antiparallel asszociáció"-t létesít. Bizonyos bázisokat, amelyek a természetes nukleinsavakban általában nem fordulnak elő, bevihetünk a találmány szerinti nukleinsavakba, ilyen például az inozin és a 7-dezaguanin, amelyeknél nem szükséges a tökéletes komplementaritás; a stabil duplexek tartalmazhatnak rosszul párosodott (mismatched) bázispárokat és nem összeillő (unmatched) bázisokat. Azok, akik a nukleinsav technológiában járatosak, empirikusan meg tudják határozni a duplex stabilitását, ha tekintetbe vesznek egy sor változót, ilyen például az oligonukleotid hossza, az oligonukleotid bázis-összetétele és szekvenciája, az ionerő és a rosszul párosodott bázispárok előfordulása.

Egy nukleinsav duplex stabilitását az olvadási hőmérséklettel (melting temperature = T_m) mérik. Egy adott nukleinsav duplex T_m értéke speciális feltételek mellett az a hőmérséklet, amelynél a bázispárok mintegy fele szétvált. A nukleinsavak T_m értékének kiszámítására szolgáló egyenlet jól ismert a szakterületen. A szálról rendelkezésre álló információkból a T_m becsült értéke az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\%form) - 500 L,$$

ahol M a monovalens kationok molaritása, $(\%GC)$ a DNS-ben guanozin és citozin nukleotidok százaléka, $(\%form)$ a hibridizációs oldatban lévő formamid százaléka és L = a hibrid hossza bázispárokból kifejezve. [Lásd például: Guide to Molecular



Cloning Techniques, S.L.Berger, A.R.Kimmel (szerk.), Methods in Enzymology, 152, 401 (1987)]. Más közlemények, amelyek a T_m kiszámításához strukturális, valamint szekvencia jellemzőket is figyelembe vesznek, bonyolultabb számításokat tartalmaznak.

A "szonda" ("probe") kifejezés, ahogyan itt használjuk, bármilyen olyan atomra vagy molekulára vonatkozik, amelyet fel lehet használni arra, hogy kimutatható (előnyösen mérhető) szignált adjon és amelyet hozzá lehet kapcsolni egy nukleinsavhoz vagy proteinhez. A jelzések olyan szignálokat adhatnak, amelyek fluoreszcencia, radioaktivitás, kolorimetria, gravimetria, röntgen diffrakció vagy abszorpció, mágnesség, enzim-aktivitás és hasonlók segítségével detektálhatók. Ilyen jelzések adhatók a jelen találmány szerinti oligonukleotidokhoz.

A "nukleinsav szubsztrátum" vagy "nukleinsav templát" kifejezéseket itt felváltva használjuk és ezek a kifejezések egy olyan nukleinsav molekulára vonatkoznak, amely egyszálú vagy kétszálú DNS-t vagy RNS-t tartalmazhat.

A "lényegében egyszálú" kifejezés, ha egy nukleinsav szubsztrátumra vonatkozóan használjuk, azt jelenti, hogy a szubsztrátum molekula elsődlegesen mint egyszálú nukleinsav jelenik meg, ellentétben egy kettőszálú szubsztrátummal, amely mint kétszálú nukleinsav létezik, és a szálakat szál-közi bázis párosodási kölcsönhatások tartják össze.

A "szekvencia változat" kifejezés, ahogyan itt használjuk, két nukleinsav templát közötti nukleinsav szekvencia különbségekre vonatkozik. Például, egy vad típusú strukturális gén és a vad típusú strukturális gén mutáns formája eltérhet egymástól



szekvenciában egyetlen bázis szubsztitúciója és/vagy deléciója révén, vagy egy vagy több nukleotid inszerciója révén. A strukturális génnek erről a két formájáról mondjuk, hogy szekvenciában tér el az egyik a másiktól. A strukturális génnek egy második mutáns formája is lehet. E második mutáns formáról azt mondjuk, hogy szekvenciában mind a vad típusú géntől, mind a gén első mutáns formájától különbözik. Meg kell jegyezni, hogy jóllehet a találmányhoz nem szükséges összehasonlítani egy gén egy vagy több formáját a szekvencia változatok kimutatásához, ilyen összehasonlítások azonban mégis lehetségesek a találmány szerinti oligo/szilárd hordozó-mátrix segítségével, olyan speciális hibridizációs körülmények alkalmazásával, mint amilyeneket az USSN 08/231,440 sorozatszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés — amelyet itt referenciának tekintünk — leír.

A "génszekvenciához illeszthető vagy vele komplementer oligonukleotid primerek" megfogalmazás olyan oligonukleotid primerekre vonatkozik, amelyek képesek megkönnyíteni egyszálú vagy kétszálú nukleinsavak templat-függő szintézisét. Az olyan oligonukleotid primereket, amelyek egy génszekvenciához hozzáilleszthetők vagy vele komplementerek, fel lehet használni PCR eljárásokban, reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR) eljárásokban és hasonlóknban.

A "konszenzus génszekvencia" egy olyan génszekvenciára vonatkozik, amely két vagy több génszekvencia összehasonlítása alapján állapítható meg és amely azokat a nukleotidokat írja le, amelyek a leggyakrabban fordulnak elő a gének egy adott szegmen-



tumában; a konszenzus szekvencia a kánoni (általánosan elismert) szekvencia.

Az itt használt "protein" és "proteáz" kifejezések metalloproteázra vonatkoznak. A "metalloproteáz" kifejezés egy natív fémfüggő proteázra vonatkozik, valamint ennek egy olyan fragmentumára, mutánsára vagy homológjára, amely még megtartotta funkcióját. A találmány a különböző fajokból származó metalloproteázokra (vagy "dezintegrinek"-re) és ezeknek rekombinációs módszerekkel, *in vitro* módszerekkel vagy standard peptid szintézissel való előállítására is vonatkozik. Előnyös, ha a protein egy humán dezintegrin vagy mutánsa. A protein mutánsainak meghatározása céljára az előnyben részesített "natív" protein részleges leírása — amelyet referenciának tekintünk és amelyre az alábbi szekvenciánál hivatkozunk — megtalálható a Z48579 GenBank jegyzékszám alatt. Homológ dezintegrinek közé tartoznak a szakmai értelemben legalább 90 % homológiát mutató teljes proteinek vagy fragmentumaik. Felismerték, hogy néhány fajok közötti eltérés előfordulhat, beleértve az inszerciókat vagy deléciókat, amelyek a funkciót vagy megváltoztatják, vagy nem. Például egy patkány proteint, amely 95 %-ban homológ a peptid szekvencián alapuló proteinnel és egy marha proteint (amely DNS szekvencián alapul), amely 97-98 %-ban homológ első 300 bázispárja alapján, egyformán homológnak tekintünk. Tájékoztatásul: a Z48444 GenBank jegyzékszám (1944. febr. 25.) alatt található egy 2407 bázisból álló patkány gén, amely valószínűleg egy patkány dezintegrin metalloproteáz gén; a Z21961 GenBank jegyzékszám (1944. okt. 25.) alatt található egy gén 2397 bázist tartalmazó rész-



szekvenciája, amely valószínűleg egy bovin cink-metalloproteáz gén. Ez a metalloproteáz előnyösen egy homán dezintegrin, mint alább leírjuk.

Az "antitest" kifejezés egy dezintegrin elleni vagy fragmentuma elleni antitestre vonatkozik. Ezek lehetnek monoklonálisak vagy poliklonálisak és több forrásból származhatnak. A találmány ezen antitestek fragmentumaira is vonatkozik, akár milyen protein vagy peptid technikában alkalmazott eljárással vannak előállítva.

A "betegség szűrés" ("disease screen") kifejezés egy betegség vagy betegséggel járó állapot szűrésére vonatkozik. Egy betegséggel járó állapot a betegség fiziológiai vagy celluláris vagy biokémiai megnyilvánulása (manifesztációja). Előnyös, ha a szűrést egy állat test-szövetein vagy test-folyadékain, vagy sejttenyészetén végezzük standard technikák — ilyen az ELISA — alkalmazásával. A szűréshez tartozik a betegség "feltérképezése" az egész szervezetben, például szisztémása adott — fent leírt — antitesttel, tekintet nélkül a kimutatási módszerre. Előnyös kimutatási módszerek a következők: fluoreszcencia, röntgen (beleértve a CAT scan-t), NMR (beleértve az MRI-t) és hasonlók.

A "vegyület szűrés" kifejezés az olyan módszerekre és szűrésekre vonatkozik, amelyek a vegyületek felfedezésével, a proteázhoz való affinitások meghatározásával vagy a vegyületek szűrésen alapuló tervezésével vagy szelektálásával kapcsolatosak. Egy másik kiviteli alakban a gyógyászati szer tervezéséhez, előnyösen — szakmai értelemben — a "racionális gyógyszer tervezés"-hez a háromdimenziós szerkezetet használjuk. Előnyös lehet,



ha a proteáz "lényegében tiszta formában" áll rendelkezésre, amely kifejezés egy olyan proteínre utal, amely elfogadható módon mentes más szennyezésektől és ez alkalmassá teszi kísérletek vagy vizsgálatok céljára. Ennek a szűrési módszernek a használata segíti a gyakorlott szakembert abban, hogy olyan új struktúrákat fedezzen fel — akár kémikus, akár a természet alkotta — amelyek kötődnek a proteázhoz és előnyösen gátolják azt. Ezek az "inhibitorok" hasznosak lehetnek a proteázok aktivitásának szabályozásában vagy modulálásában és felhasználhatók annak a biológiai kaszkádnak a modulálásában, amelyben működnek. Ez a megoldás új, gyógyszerészetileg hasznos vegyületeket teremt.

A "dezintegrin" kifejezés egy dezintegrinre, egy fragmentumára, egy mutánsára, vagy egy olyan homológjára vonatkozik, amely még megtartotta funkcióját. Ez a kifejezés vonatkozik az aggregánzra és más olyan proteázokra, amelyek a szövet átalakításban vesznek részt vagy azt modulálják. Itt különböző fajokból származó dezintegrinekről van szó és olyanokról, amelyeket rekombinációs módszerekkel, *in vitro* módszerekkel vagy standard peptid szintézissel állítanak elő. A proteín előnyösen egy humán dezintegrin vagy mutánsa. A mutánsok proteínre vonatkoztatott definiálása végett lásd a Z48579 GenBank jegyzékszám alatti részleges leírást. Ezt a leírást itt referenciának tekintjük és utalunk az alábbi szekvenciára. Az 1. számú szekvencia (SEQ.ID.NO:1) ennek a DNS-nek egy fragmentumát és ennek átíratát írja le, a 2-számú szekvencia pedig a gén által kódolt proteint írja le. Homológ dezintegrinek közé tartoznak a teljes proteinek — legalább 90 %-os szakmai értelemben vett homológiával — vagy



ezek fragmentumai. Például: egy patkány proteint, amely 95 %-ban homológ a 2. számú szekvencia szerinti proteinnel az 1. számú szekvenciát tartalmazó DNS vagy cDNS szekvenicából származó aminosavszekvencia alapján és egy bovin proteint, (hasonló származású), amely 97-98 %-os homológiát mutat, egyaránt homológnak tekintünk. Tehát a homológ cDNS-ek, amelyeket más organizmusokból klónoztak, homológ proteineket hoznak létre.

Ugyanígy homológnak tekinthetők azok a proteinek, amelyek csak az aminosavszekvencia alapján homológok. Az aminosav szekvenálás gyakorlati korlátai lehetővé teszik annak meghatározását, hogy egy protein egy másikkal homológ-e, például úgy, hogy összehasonlítjuk a protein első 50 aminosavát. Ebből következően egy 90 %-os homológia megengedne 5 eltérő aminosavat a homológ protein első 50 aminosavából álló láncban.

A gyakorlott szakember tisztán látja, hogy a genetikai kód degenerált volta biztosítja a különböző DNS szekvenciák számára, hogy azonos átíratot hozzanak létre és ennél fogva azonos proteint. Bizonyos esetekben annak a DNS szekvenciának az előállítását, amely ugyanazon proteint kódolja, de a natív DNS-től különbözik, az alábbiakat vonja maga után:

- kényelmes szekvenálást vagy szintézist;
- a protein megnövekedett expresszióját; és
- néhány heterológ gazda előszeretettel bizonyos kodonok iránt, másokkal szemben.

Ezek a gyakorlati megfontolások széles körben ismertek és olyan kiviteli alakokra adnak lehetőséget, amelyek a találmány felhasználói számára előnyösek lehetnek. Tehát világosan kinyil-



vánítjuk, hogy a natív DNS nem az egyetlen előirányzott kiviteli forma ebben a találmányban.

Ezenkívül a gyakorlott szakember számára nyilvánvaló, hogy a protein fragmentumai is használhatók a szűrésben, gyógyszer tervezésben és hasonlóknban, és hogy a teljes protein valószínűleg nem szükséges a találmány alkalmazásához. Tehát természetesen azt gondoljuk, hogy a gyakorlott szakemberek meg fogják érteni, hogy a proteinnek és alkalmazásainak az ismertetése egyben a használható peptid fragmentumokra is vonatkozik.

A protein expresszió, a tisztítás kihozatala, a stabilitás, oldhatóság és hasonlók gyakorlati fontosságát tekintetve veszik a gyakorlott szakemberek, amikor választanak, hogy vajon fragmentumot használjanak-e és a fragmentum a használandó. Végülis a szakterület rutin gyakorlatát követő szakember — miután adott ez a lehetőség — a találmány alkalmazásakor a protein fragmentumait is használhatja.

Tehát a találmány kifejezetten arra vonatkozik, hogy a gén teljes nukleinsavszekvenciájának kisebb része és a protein teljes aminosav szekvenciájának kisebb részére is használható. A protein fragmentumai a szűrésben, gyógyszer tervezésben és hasonlóknban használhatók és a találmány alkalmazásakor nem követelmény a teljes protein alkalmazása. Maga a protein a kis molekulák proteinhez való kötődési aktivitása meghatározására szolgálhat. A szakterületen a gyógyászati szer szűréséhez enzim cél-molekulákat használnak és ezek automatizált, nagy teljesítményű technológiákban alkalmazhatók.

A protein vagy maga a proteáz használható a kis molekulák



proteinekhez való kötődési aktivitásának a meghatározására. A szakterületen végeznek enzim cél-molekulákkal gyógyászati szerepű szűrést, amelyek automatizált, nagy teljesítményű technológiákban alkalmazhatók.

A dezintegrin aktivitás gátlása a hatásosság előhírnöke lehet az osteoarthritis és más olyan betegség kezelésében, amelyek az ízületi porc és más, mátrix degradációt mutató szövetek degenerációjával — mint a szövet átalakulás és hasonlók — járnak.

Génterápia

Azt gondoljuk — elméleti kötöttség nélkül — hogy osteoarthritis alatt a metalloproteáz "felregulálódik" a szövetekben. Meglepő módon azt tapasztaltuk hogy a humán dezintegrin aktivitás osteoarthritis-es körülmények között a kondrocitákban (porcsejtekben) felerősödik. A jelátviteli mechanizmus gátlása eredményre vezet az esemény-kaszád felszakításában osteoarthritisben és más olyan betegségekben, amelyekben porc degeneráció megy végbe. A gyakorlott szakember el fogja ismerni, hogy amennyiben aktivitás növekedés az oka az arthritis kialakulásának, akkor a gén aktivitás akadályozása hasznos lehet az osteoarthritis kezelésében.

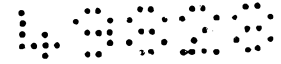
A rendelkezésre álló módszerek bármelyikével ez megvalósítható, beleértve a génterápiát (azaz antiszensz génterápiát).

A proteáz tisztítása

A dezintegrin vagy dezintegrin fragmentumok tisztításához rekombináns dezintegrin vagy a teljes hosszúságú proteín fragmentumait tartalmazó táptalajokat, emlős, élesztő, rovar vagy eukarióta sejt eredetű kivonatokat vagy zárványtesteket használ-



lunk. A denaturált dezintegrin oldatai visszagombolyíthatók a kromatográfiás gyantákon végzett egymás után következő tisztítások előtt vagy az elválasztás utolsó lépése után. A táptalajokat, a sejt kivonatokat vagy az oldhatóvá tett dezintegrin detergens vagy detergens kombinációk, denaturáló szerek vagy szerves oldószerek — például oktul-glikozid, karbamid vagy dimetil-szulfoxid — jelenlétében — szükség szerint — dolgozzuk fel. Ioncserés és hidrofób kölcsönhatás alapú kromatográfiát használunk egyedileg vagy kombinációban a rekombináns dezintegrin szennyező sejt-anyagoktól való elválasztására. Az anyagot felvisszük az oszlopra és a dezintegrin pH beállítás, ionerő változtatások, denaturáló szerek hozzáadása és/vagy szerves oldószerek használata segítségével oldjuk ki. A dezintegrin tartalmazó oldatokat ezután általában antitest affinitás oszlopon vagy ligand-affinitás oszlopon engedjük át a dezintegrin helyspecifikus tisztítása céljából. Az immunaffinitás oszlop szilárd hordozón — ilyenek a Sepharose 4B (Pharmacia) vagy más hasonló anyagok — immobilizált dezintegrin specifikus antitestet tartalmaz. Előnyös, ha az oszlopot mossuk a kötetlen proteinek eltávolítására és a dezintegrin alacsony pH-n glicin pufferrel vagy magas ionerővel eluáljuk. A ligand-affinitás oszlop specifikus lehet a dezintegrin aktív helyére, vagy a molekula egy olyan részére, amely az aktív hely szomszédságában vagy attól távolabb van. Az oszlopot mossuk és a dezintegrin úgy oldjuk le, hogy az elúciós pufferhez egy kompetitív molekulát adunk. Előnyös, ha a tisztítási eljárás alatt végig egy vagy több proteáz inhibitor van jelen, mint például benzamidin, leupeptin, foszforamidon,



fenil-metil-szulfonil-fluorid és 1,10-fenan-trolin. A dezintegrin oldhatóságának és stabilitásának a növelésére különböző detergenseket — például oktil-tio-glikozidot és Triton X-100-at — vagy kémiai szereket — például glicerint — adhatunk az oldathoz. A protein végső tisztítását — amennyiben szükséges — kromatográfiás oszlopon végzett gélszűréssel fejezhetjük be.

Proteáz inhibitorok

A találmány szerinti proteázt fel lehet használni proteáz inhibitorok felkutatására. Ezenkívül, szűréshez eszközként, vagy racionális gyógyszer tervezéshez használható. Elmélethez való kötöttség nélkül elmondható, hogy a proteáz modulálhatja a celluláris átalakulást, tény, hogy fokozhatja az extracelluláris mátrix átalakulását és ezáltal fokozhatja a szövetek szétbomlását. A dezintegrin gátlása tehát terápiás utat kínál azon betegségek kezeléséhez, amelyeket ilyen folyamatok jellemeznek.

Szűrésnél egy gyógyszervegyület felhasználható a gátlás minőségének és mennyiségének a meghatározására. Végeredményben egy ilyen szűrés információt nyújt olyan hatóanyagok, előnyösen olyan kis molekulatömegű hatóanyagok szelektálására, amelyek ilyen betegségek kezelésére alkalmazhatók.

A dezintegrin metalloproteáz aktivitás kis molekulatömegű, szintetikus metalloproteáz inhibitorokhoz — ilyeneket használunk a mátrix metalloproteázok gátlására — való kötés útján történő gátlása a gyógyításban az extracelluláris mátrix átalakulásának gátlására lenne használható.

A protein elleni antitestek

A metalloproteázokat úgy tehetjük cél-enzimekké, ha egy



metalloproteáz inhibitorot metalloproteáz elleni antitesttel vagy ennek fragmentumával konjugálunk. A konjugációs módszerek ismeretek ezen a szakterületen. Ezeket az antitesteket mind a terápiában, mind az inhibitorok adagolásának monitorozásában alkalmazhatjuk.

A találmány szerinti antitestet szilárd hordozóhoz is konjugálhatjuk. Ezeket a konjugátumokat mind affinitás reagenseket alkalmazhatjuk a kívánt metalloproteáz, előnyösen a dezintegrintisztítására.

Egy másik kiviteli alakban a találmány szerinti antitestet közvetlenül konjugálhatjuk a jelzővel. Minthogy az antitest kötődik a metalloproteázhoz, a jelző felhasználható *in vivo* vagy *in vitro* sejttenyészetben a metalloproteáz viszonylag magas szinteken való jelenlétének a kimutatására.

Használhatunk például olyan célzó ligandumot, amely specifikusan reagál a szóbanforgó cél-szövet egy markerével. Jól ismertek azok a módszerek, amelyekkel a találmány szerinti vegyület a célzó ligandumhoz kapcsolható és ezek hasonlóak azokhoz, amelyeket a hordozóhoz való kötéshez használnak (a leírást lásd alább). A konjugátumokat úgy formulázzuk és alkalmazzuk, mint fent leírtuk.

Antitestek termelése és alkalmazása

Antitesteket számos módszerrel tudunk előállítani, például úgy, hogy a proteint megfelelő (például emlős) szervezetekbe — beleértve egereket, nyulakat és hasonlókat — oltjuk be. Az előnyös eljárásokban az immunogént ismételt injekciókkal visszük be adjuváns jelenlétében egy olyan séma szerint, amely fokozza



az antitest termelést a szérumban. Az immunszérum títere könnyen megmérhető olyan immunassay-k alkalmazásával, amelyek már standard eljárások a szakterületen.

A kapott antiszérumok közvetlenül felhasználhatók, vagy pedig monoklonális antitesteket állítunk elő úgy, hogy az immunizált állat perifériás vér limfocitáit vagy a lépet learatjuk és az antitest termelő sejteket immortalizáljuk, majd az alkalmas antitest termelő egyedeket standard immunassay technikákkal azonosítjuk.

A poliklonális vagy monoklonális készítmények a találmány szerinti vegyületekkel végzett terápiás vagy profilaktikus eljárások monitorozásában használhatók. Megfelelő mintákat — ilyenek a vérből, szérumból, vizeletből vagy nyálból származó minták — tesztelhetünk a protein jelenlétére a kezelési eljárás különböző időpontjaiban olyan standard immunassay technikákkal, amelyekben a találmány szerinti készítményeket alkalmazzuk.

Ezekhez az antitestekhez jelzőket is kapcsolhatunk — például szcintigráfiás jelzőket, mint a Tc-99 vagy I-131 — standard konjugációs módszerekkel. A jelzett vegyületeket beadjuk a betegeknek, hogy meghatározzuk egy vagy több metalloproteáz többlet mennyiségének a helyzetét in vivo. Tehát a protein elleni jelzett antitest úgy működik, mint a betegségre utaló fokozott expresszió szűrésének eszköze.

Abból a körülményből, miszerint az antitestek szelektíven képesek kötődni a metalloproteázhoz, az az előny származik, hogy ezen enzimek in situ eloszlását fel tudjuk térképezni. Ez a technika szövettani eljárásokban is alkalmazható és a jelzett



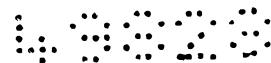
antitestek kompetitív immunassay-kben is felhasználhatók.

Az antitestek ismert módszerek segítségével eredményesen kapcsolhatók más vegyületekhez vagy más anyagokhoz. Például azoknál az anyagoknál, amelyek funkciós karboxil csoportot tartalmaznak, a karboxil csoportot aldehiddé redukálhatjuk és hordozóhoz köthetjük oldallánc aminocsoportokkal való reakció útján, amelyet adott esetben a képződött imino kötés redukciója követ. A karboxil csoportot az oldallánc aminocsoportjaival kondenzáló szerek használatával is reagáltathajtuk. Ilyen kondenzáló szerek például a diciklo-hexil-karbo-diimid vagy más karbodiimid dehidrááló szerek. A linker vegyületek a konjugálás megvalósítására használhatók. Mind a homobifunkciós, mind a heterobifunkciós linkerek beszerezhetők a Pierce Chemical Company-tól (Rockford, Ill.).

Ezek az antitestek megfelelő kromatográfiás anyaghoz konjugálva, a protein izolálásában alkalmazhatók. Az affinitás kromatográfiát alkalmazó elválasztási módszerek jól ismertek ezen a szakterületen és a gyakorlott szakemberek gyakorlatához tartoznak.

Betegség marker

Mint fent megjegyeztük, a találmány a metalloproteáz gének expressziójának kimutatására vonatkozik mintákban, beleértve a beteg szövet-mintákat is. Nem akarjuk, hogy a találmányt a nukleinsav forrás (akár DNS, akár RNS) természete korlátozza, a találmány a különböző forrásokra egyaránt vonatkozik, beleértve, de nem kizárólag az emlős (például: rákos szövet, limfociták, stb.) forrásokat.



Anélkül, hogy kötve lennénk elmélethez, a gének expressziójának és különösen ennek a génnek a szöveti eloszlása korlátozott lehet és expresszióját potenciális osteoarthritis mediátorok erősítik. Ennek a génnek (tehát a proteinnek) a fokozott expressziója például az ízületi kondrocitákban, az osteoarthritis kifejlődésének — beleértve a legkorábbi tünetmentes állapotokat — és progressziójának markeréül szolgál. Ennélfogva a protein ellen termelt antitest a betegségre utaló fokozott expresszióra való szűrés eszközeként kerülhet alkalmazásra.

Ezenkívül, amikor egy betegség szűrésére használjuk, az antitesteket kromofor vagy fluorofor tartalmú anyagokkal konjugálhatjuk, vagy konjugálhatjuk olyan enzimekkel, amelyek kromoforokat vagy fluoroforokat képeznek bizonyos körülmények között. A konjugáláshoz használt anyagok és módszerek jól ismertek a szakterületen. Amennyiben ilyen módon alkalmazzák, a protein kimutatása immunassay-vel a gyakorlott szakember számára rutin munka. A testfolyadékok (szérum, vizelet, szinoviális folyadék) például ilyen módon szűrhetők kalibrálás végett, a metalloproteázok eloszlásának vagy ezen proteázok megnövekedett szintjének a kimutatása végett.

Amennyiben ilyen módon alkalmazzuk, a találmány egy hasznos diagnosztikus és/vagy klinikai markere a metalloproteáz által közvetített betegségeknek, mint amilyenek az osteoarthritis vagy más degeneratív ízületi porc betegségek, vagy más olyan betegségek, amelyeket az extracelluláris mátrix lebomlása vagy átalakulása jellemez. Mihelyt a betegséget kimutattuk, már a tünetek megjelenése vagy a legyengülés előtt kezelhetjük.



Ezenkívül ezek az antitestek eljuttathatók a beteg szövet-hez kimutatás vagy kezelés céljából, mint fent leírtuk.

Nukleinsav alapú technikák

A sejtek nukleinsav tartalma dezoxiribonukleinsavból (DNS) és ribonukleinsavból (RNS) áll. A DNS tartalmazza a sejt genetikai lenyomatát. Az RNS a DNS szekvencián alapuló proteinek termelésében mint közti termék szerepel. Az RNS a sejten belül három formában létezik: strukturális RNS (azaz riboszómális RNS, „rRNS”), transzfer RNS („tRNS”), amely a transzlációban vesz részt és messzendezer RNS („mRNS”). Minthogy az mRNS a DNS-ben kódolt genetikai információ és a megfelelő proteinek közötti intermedier molekula, a sejt mRNS komponense bármely adott időpontban a sejt fiziológiai állapotának képviselője. Azzal a céllal, hogy vizsgáljuk és felhasználjuk a sejt molekuláris biológiáját, fontos, hogy tisztítani tudjuk az mRNS-t, beleértve az mRNS-nek egy mintában lévő össz nukleinsavból való tisztítását.

Az RNS izolálását a ribonukleázok jelenléte bonyolítja, amelyek bontják az RNS-t [lásd például: T.Maniatis et al., *Molecular Cloning*, 188-190 old., Cold Spring Harbor Laboratory (1982)]. A sokszorozható RNS izolálását megnehezíti az mRNS-sel társult ribonukleoproteinek jelenléte is [R.J.Slater közlése a „*Techniques in Molecular Biology*” című kiadványban (113-120 old.); J.M.Walter, W.Gaastra (szerk.), Macmillan, N.Y. (1983)].

A nukleinsav tisztítása sejtekből általában a következő lépéseket tartalmazza: 1) sejt lizálás, 2) a celluláris nukleázok inaktiválása, 3) a kívánt nukleinsav elválasztása sejt törmelékektől és más nukleinsavaktól. A sejt lízist különböző módsze-



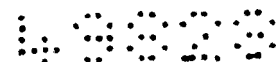
rekkel érhetjük el, például enzimes kezeléssel vagy detergenssel vagy kaotróp szerrel való kezeléssel. A celluláris nukleázok inaktiválását proteázok és/vagy erős sók alkalmazásával végezhetjük. Végül, a kívánt nukleinsav elválasztását általában a nukleinsav fenolos vagy fenol-kloroformos extrahálásával végezzük; ez a módszer a mintát vizes fázisra (ez tartalmazza a nukleinsavat) és szerves fázisra (ez tartalmazza az egyéb sejt alkotórészeket, a proteinekkal együtt) választja szét. Az általánosan használt eljárások sók használatát írják elő, fenollal együtt [P.Chomczynski and N.Sacchi, *Anal.Biochem.*, 162, 156 (1987)], vagy egy centrifugálási lépés alkalmazását a protein eltávolítására (R.J.Slater, lásd fentebb).

Mihelyt a nukleinsav frakciót a sejtől izoláltuk, az mRNS molekula szerkezetét használhatjuk arra, hogy az mRNS DNS-től vagy más RNS molekulától való megtisztításában segítségünkre legyen. Minthogy a magasabbrendű szervezetek mRNS-e rendszerint poliadenilált 3' végén („poli-A farok” vagy „poli-A track”) az RNS sejtekből való izolálásának egy eszközét arra alapozták, hogy a poli-A farok komplementer szekvenciájához (azaz oligo-dT-hez) kötődik, amelyet hordozóhoz — például cellulózhoz — kötöttek. A hibridizált mRNS/oligo-dT-t általában centrifugálással választják el a mintában lévő egyéb komponensektől, vagy mágneses kiviteli formák esetén mágneses tér hatásának való expozícióval. Mihelyt a hibridizált mRNS/oligo-dT-t elválasztottuk a minta más alkotórészeitől, az mRNS-t rendszerint eltávolítjuk az oligo-dT-ről. Azonban bizonyos alkalmazások céljára az mRNS kötve maradhat a szilárd hordozóhoz kapcsolt oligo-dT-hez.



Az oligo-dT-vel összekapcsolt szilárd hordozók széles változatát fejlesztették ki, amelyek a kereskedelemből beszerezhetőek. A cellulóz maradt a leggyakoribb hordozó a legtöbb oligo-dT rendszerben, de latex szemcsékhez és paramágneses részecskékhez kovalensen kötött oligo-dT formátumokat is kifejlesztettek és ezek is kaphatók a kereskedelemben. A paramágneses részecskék biotin-avidin rendszerben is használhatók, ahol a biotinezett oligo-dT-t oldatban az mRNS-hez anellálják. A hibrideket ezután sztreptavidinnel fedett paramágneses részecskékkel fogatják be és mágneses tér alkalmazásával választják el. Ezek mellett a módszerek mellett vannak még változatok, ilyen például az eukarióta össz RNS-ből származó poliadenilált RNS affinitás tisztítása centrifuga-oszlop (spun-column) kivitelezésben. Ezek a megoldások a poli-A mRNS hibridizációjával is számolnak, de hatékonyságuk és érzékenységük változó.

Egy kiviteli alakban az mRNS-t reverz transzkriptázzal kezeljük cDNS előállítására véget. A cDNS-t primer meghosszabbításnál (extenzió) használhatjuk PCR-ben az alább leírt primerekkel). Tehát a találmány olyan nukleinsav molekulákra vonatkozik, amelyek az alább leírt primerek segítségével végzett primer meghosszabbítással mutathatók ki. A primer extenziót (illetve a PCR-t) olyan feltételek (úgynevezett „igen szigorúan meghatározott feltételek”) között végezhetjük, ahol csak a komplementer nukleinsav fog hibridizálni (a részben komplementer nukleinsav hibridizációjával szemben). Ezek a feltételek magukba foglalják a duplex olvadási hőmérsékleténél (melting temperature) vagy egy ehhez közeli hőmérsékleten való anellálását.



Specifikus dezintegrin metalloproteáz génre irányuló primerek

A találmány egy új dezintegrin metalloproteáz gén részleges nukleinsav szekvenciájának teljes hosszúságú proteint kódoló régiójára vonatkozik. A szekvencia egyebek között a dezintegrin metalloproteáz gén-expresszió kimutatására használható. Egy kiviteli alakban olyan primereket használunk a génszekvencia jelenlétének vagy nemlétének a kimutatására, amelyek az említett részleges szekvencia egy darabjára irányulnak. Ezeket a primereket egy olyan cDNS klón azonosítására is fel lehet használni, amely a teljes gént reprezentálja, számításba véve a dezintegrin metalloproteázt vagy fragmentumait (vagy mutánsait) kódoló nukleinsavszekvencia rekombináns expresszióját egy gazdasejtben.

Előnyös primerek a következők: a 9. számú szekvencia szerinti primer (5' -AGCCTGTGTC-3') és a 10. számú szekvencia szerinti primer (5' -AGCCTGTGTCTGAACCACT-3'). Egyébként más primerek is könnyen megtervezhetők a 5. számú szekvencia és az 1. számú szekvencia által leírt szekvenciák alapján.

Biológiai minták összehasonlítása differential display módszerrel

Az eredményes sokszorozást a reakcióból kapott termék(ek) vizsgálata bizonyíthatja. Azt kívánjuk, hogy a találmányt a meghosszabbítás termékeinek vagy a PCR termékeinek a kimutatására szolgáló módszer ne korlátozza. Egy kiviteli alakban a PCR termékeket nagy felbontó képességű agaróz gél elektroforézissel — 2 %-os agaróz gélek (BRL) alkalmazásával — analizáltuk és a sokszorozott DNS fragmentumokat etidium-bromidos festéssel és UV átvilágítással tettük láthatóvá. A találmány egyik kiviteli alakjában elektroforézist használunk a termék képződésének bizo-



nyítására és a minták eredményeinek egymással való összehasonlítására.

A találmány tehát az új dezintegrin metalloproteáz génszekvenciák nukleinsav keverékekben (például cDNS vagy RT-mRNS) való kimutatására vonatkozik. Egy nukleinsav keveréken végzett PCR-rel és a termékek géleken való futtatásával „izoláljuk” azt a nukleinsavat, amely a primerek által definiált szekvenciát tartalmazza. A terméket ezután úgy „tisztíthatjuk”, hogy a gélből kivágjuk a sávot (vagy más alkalmas módszert használunk, például elektroelúciót).

A „szekvenciák jegyzéke” áttekintése

Az olvasó kedvéért a szekvencia-jegyzék összefüggéseit az alábbiakban ismertetjük.

Az 1. számú szekvencia (SEQ.ID.NO:1) egy töredékes DNS szekvencia, és része a 3. számú szekvenciának. Az 1. számú szekvencia első bázisa (citozin vagy C) a 3. számú szekvencia 940. bázisa. A DNS szekvenciák azonosak, ahol egymást fedik.

A 2. számú szekvencia és a 4. számú szekvencia az 1. számú szekvencia, illetve a 3. számú szekvencia által kifejezett aminosavszekvenciák. A 2. számú szekvenciában az első aminosav, a Gln, a 4. számú szekvenciában a 309. aminosav. A két szekvencia a protein karboxiterminális végével homológ.

A 7. számú szekvencia a differential display kísérletek révén kapott DNS szensz szála. A 7. számú szekvencia első bázisa az 1. számú szekvencia 1371. bázisának és a 3. számú szekvencia 2310. bázisának felel meg. Ezek a szekvenciák 452 bázist illetően homológok az 1. számú szekvencia 1822. bázisáig és a 3. számú



szekvencia 2761. bázisáig. Az 1. számú szekvencia és a 3. számú szekvencia két utolsó bázisának a különbözősége a szekvenálás hibájának tudható be, vagy pedig a PCR-ben lévő általános replikációs hibának, vagy lehet, hogy egy klónozó vektor része. A 7. számú szekvencia a homológ részen túl mintegy 284 bázissal folytatódik, tehát jóval túl terjed az 1. számú szekvencia és a 3. számú szekvencia végétől.

Ezenkívül a 7. számú szekvenciában a 477-716 bázisok teszik ki a 6. számú szekvenciát. A 6. számú szekvencia az 5. számú szekvencia szensz szála. Az 5. számú szekvencia egy antiszensz szál, amelyet a differential display klónozás után találtunk. A 6. számú szekvencia tehát a DNS irányát mutatja, ahogyan ez az RNS-ben jelenik meg. Ez a két szekvencia e gén 3' végéhez közel található.

Jóllehet a 7. számú szekvencia 3' végéig tartó 452 bázis eltér az 1. számú szekvenciától és a 3. számú szekvenciától, a 7. számú szekvencia mégis érvényes. Lényegesnek tartjuk megjegyezni, hogy az expresszált peptid-szekvenciát nem érinti ez az eltérés. Ezek a bázisok valószínűleg nem jelennek meg az 1. számú szekvenciában és a 3. számú szekvenciában, egy alternatív poliadenilációs szignál következtében.

A 8. számú szekvencia egy új, teljes hosszúságú DNS szekvencia. A 9. számú szekvencia a 8. számú szekvencia által kifejezett új protein. A 9. számú szekvencia abban tér el a 4. számú szekvenciától, hogy a 4. számú szekvencia 162(Ser) - 213(Tyr) aminosavait egyetlen csoport (Asn) helyettesíti a 9. számú szekvencia 162. pozíciójában. Ez az eltérés a DNS-ben az 501 - 654



bázisok — összesen 153 bázis — deléciójában mutatkozik meg, a leolvasási keretet érintetlenül hagyja, de egy csoportot megváltoztat és a 4. számú szekvenciában meglévő 51 aminosavat törli.

A 10. számú szekvencia és a 11. számú szekvencia PCR-ben használható antiszensz primerek, és a 7. számú szekvencia 3' -végeinek fordítottjai. Az itt ismertetett szekvenciákat alkalmazó gyakorlott szakemberek primerek céljára más szekvenciákat is ismerhetnek.

A következő példákkal — amelyekkel nem óhajtjuk korlátozni a találmány oltalmi körét — a találmány egy előnyös kiviteli alakját szemléltetjük és röviden ismertetjük a találmány alkalmazási területét. Ezeket a példákat a gyakorlott szakemberek számára segítségül adjuk közre és ezek a példák semmiképpen nem korlátozzák a találmányt. Felvértézve ezzel a kitéttel és ezekkel a példákkal, azok, akik ezen a szakterületen jártasak, képesek a találmány kivitelezésére és felhasználására.

A példákhoz standard kiindulási anyagokat használtunk. Az anyagok többsége ismert és a kereskedelemről beszerezhető. Például: az E.coli CJ236 és JM101 ismert törzsek, a pUB110 egy ismert plazmid és a Kunkel módszer szerinti mutagenézis szintén jól ismert ezen a szakterületen. Ezenkívül néhány sejtvonala és cDNS a kereskedelemben is kapható, például az U-937, amely a Clontech, Inc. (Palo Alto, California) cégtől beszerezhető.

Variánsok előállíthatók expressziós rendszerekkel és különböző módszerekkel, különböző gazdasejtekben. Ezek a módszerek a molekuláris biológiában vagy a biotechnológiával rokon más szakmában jártas szakemberek köteleles tudásához tartoznak.



1. példa:

Az RNS-t normál humán ízületi kondrociták (porcsejtek) nem stimulált és interleukin-1-gyel stimulált tenyészetekből izoláltuk. Az RNS-t cDNS-sé alakítottuk reverz transzkripcióval. A cDNS-t módosított differential display eljárásnak vetettük alá, egy sor random (találomra választott) primert alkalmazva.

Mind a stimulált, mind a nem stimulált kondrocitákból kapott PCR mintákat poliakrilamid géleken — szomszédos nyomsávokban — elektroforetizáltuk. Az eltérően kifejeződött sávot kivágtuk, klónoztuk és szekvenáltuk. A gén eltérő módon való kifejeződését ribonukleáz védelemmel (RNAase protection) és a kísérleteken nuclear run segítségével igazoltuk.

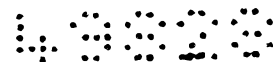
2. példa:

Interleukin-1-gyel stimulált humán ízületi (combcsont fej) kondrociták primer tenyészetéből új, proteint kódoló részleges humán sDNS-t klónoztunk, ismert módszerekkel. Azonos szekvenciát találtunk, és a gént úgy egészítettük ki, hogy humán cDNS tára-
kat szűrtünk, hogy teljes hosszúságú klónokat kapjunk.

3. példa:

A 2. példa szerinti klónozott DNS-t pUB110-be vittük be ismert módszerekkel.

Ezt a plazmidot használtuk E.coli transzformálására, és ez szolgált templátul helyre irányuló mutagenézishez, új mutánsok létrehozása céljából. A Gln-t Kunkel féle mutagenizáló módszerrel változtattuk Ala aminosavvá.



4. példa:

A [^{125}I] jelzett dezintegrin antitestet IODOBEADS (Pierce, Rockford, IL.; nem porózus polisztirol szemcséken immobilizált kloramin-T) segítségével állítottuk elő. A liofilizált antitestet (2 μg) 50 μl 10 mM ecetsavban vettük fel, és hozzáadtuk — jégen — 450 μl foszfáttal pufferolt konyhasó oldathoz (PBS) (Sigma, St. Louis, MO.). A csőhöz hozzáadtunk 5 μl -ben 500 μCurie ^{125}I -t (Amersham, Arlington Heights, IL.; 2200 Ci/mM) és egy IODOBEAD-et. A reakciót 10 percig jégen inkubáltuk, esetenkénti rázás mellett. A reakciót ezután úgy állítottuk le, hogy a reakcióelegyet a IODOBEAD-ről eltávolítottuk.

5. példa:

Fluorogén dezintegrin metalloproteáz szubsztrát-peptidet (Bachem, Guelph Mills, King of Prussia, Pa.) kevertünk a dezintegrinhez és a fluoreszcencia változást 2 perc múlva értékeltük, mint egy kontrollt. Ezután egy külön menetben a fluorogén peptidet kevertük össze a dezintegrinnel a kiértékelendő vegyület (metalloproteáz inhibitor) jelenlétében és a kiértékelést különböző időpontokban végeztük 2 - 12 órán át. Az adatokat standard metodikával értékeltük ki, hogy megkapjuk a vizsgált vegyület relatív kötődését.

6. példa:

Egy beteg bal térdéből 0,5 ml szinoviális folyadékot szívtunk le, és ELISA segítségével teszteltük megnövekedett dezintegrin szintekre. Az eredmények a normálisnál magasabb dezinteg-



rin szintet mutattak. A betegnek egy dezintegrin inhibitorból profilaktikus dózist írtunk elő orális alkalmazásra, vagy ugyanezt injekcióban adtuk a bal térdbe, mielőtt a beteg a klinikus rendelőjét elhagyta.

7. példa:

Az extracelluláris mátrix átalakulás gátlását a dezintegrin metalloproteáz aktivitás gátlása révén kutattuk. Kis molekulatömegű szintetikus metalloproteáz inhibitor — ugyanezt használtuk a mátrix metalloproteáz gátlására — alkalmazásával a szöveti integritást és a proteoglikánt monitoroztuk.

IL-1-gyel stimulált marha izületi porc eredetű orr porc egy mintáját kis molekulatömegű dezintegrin 1 mikromoláris oldatában tenyésztettük. A kísérletet kontrollal végeztük és összehasonlítottuk egy azonos tenyészettel, amelyet inhibitor nélkül tenyésztettünk. A 7 napos tenyészet vizsgálata azt mutatta, hogy a gátolt tenyészetben kevesebb a szövet lebomlás és a tenyészet szérumában kevesebb proteoglikán van jelen. Az eredmény egybevág a gátolt aggrekanáz aktivitással. Az aggrekanáz gátlása gátolja a szövet lebomlását és csökkenti a proteoglikán felszabadulását.

8. példa:

A proteolitikus folyamat gátlása, amely a dezintegrin metalloproteáz domén membránhoz kötött formájából való felszabadulását eredményezi, gátolja a membránhoz kötött dezintegrin molekula „második messzendezser” jelátvitelét. Az ilyen második messzendezser jelátvitel celluláris fenotípus változásokat hoz



létre, továbbá változásokat eredményez a gén expresszióban, változásokat a mitotikus aktivitásban és hasonlóknban.

A sejteket, amelyekről tudjuk, hogy dezintegrint tartalmaznak, szerinproteázzal kezeljük. A sejtből felszabadult proteineket standard módszerekkel mérjük. Pontosabban, a metalloproteáz aktivitást szakirodalmi módszerekkel monitorozzuk. A felszabadult metalloproteáz mennyisége korrelál a sejtek kezelésére használt szerin proteáz mennyiségével.

Az src tirozin kináz aktivitásban kontrollal szemben megnyilvánuló növekedéseket az intracelluláris proteinek Western blot analízisével mérjük — foszfortirozin specifikus monoklonális antitesteket használva — a dezintegrin metalloproteáz hasítását és felszabadulását követően. Kontrollként szolgálnak azok a sejtek, amelyeket nem kezeltünk szerin proteázzal.

A sejtben (vagyis a sejt tenyészetben) lévő src tirozin kináz aktivitást szakirodalmi módszerekkel mérjük. A dezintegrin metalloproteáz domén felszabadulását szintén szakirodalmi módszerekkel monitorozzuk. Közvetlen összefüggés áll fenn a metalloproteáz domén felszabadulása és az intracelluláris src tirozin kináz aktivitás megerősödése között. Ez az eredmény egyezik azal a jelenséggel, miszerint az src tirozin kináz kaszkád stimulációja a dezintegrin-közvetített sejt-jelátvitel stimulációjával jár.

9. példa:

Az integrin kötődést egy RGD szekvenciát tartalmazó peptiddel mérjük. Az intercelluláris adhéziós molekulák, vagy az



extracelluláris mátrix komponensek gátlása az ilyen kölcsönhatásokkal járó fenotípus változások — beleértve a sejt alakjának változásait — gátlását eredményezi. Az integrin kötődést kompetitív assay-vel mérjük, amikor is a sejtek mikroszkóppal látható alakváltozásait figyeljük meg. A peptid gátolja az ilyen celluláris változásokat. (RGD = az extracelluláris mátrixban előforduló fontos tripeptid: arginin-glicin-aszparaginsav).

Ez az eredmény egyező a dezintegrin kölcsönhatásával való versengéssel vagy ennek blokkolásával. Az RGD peptid gátolja a kondrocitákban a celluláris változásokat. Az osteoarthritis fenotípus, amelyet megnövekedett mátrix szintézis és felgyorsult mátrix metalloproteáz aktivitás jellemez, nem fordul elő. Egyéb könnyen vizsgálható celluláris változásokat is felhasználhatunk az eredmény monitorozásához, például a gén expressziót, a mitotikus aktivitás változásait és hasonlókat.

10. példa:

Egy kis molekulatömegű metalloproteáz inhibitorot használtunk egy szövet-tenyészet kezelésére a 7. példa szerinti módszert alkalmazva. A sejt-membránból felszabaduló TNF- α -t (TNF = tumor nekrosis faktor) a szakirodalomból ismert módszerekkel mértük. A 7. példában használt inhibitor a sejt membrán által szekretált TNF- α mennyiségét is csökkenti.

Ennélfogva azt gondoljuk, hogy a dezintegrin metalloproteáz aktivitás gátlása egy dezintegrinnel társult gyulladós kaszkád és szekretáz aktivitás gátlását eredményezi. Azt gondoljuk, hogy a citokinek vagy az IL-1 és hasonlók sejt-membránból való fel-



szabadulásának a monitorozása ugyanehez az eredményhez vezet.

11. példa:

Differential display szűrés betegségre

Normál humán ízületi kondrociták interleukin-1-gyel stimulált és nem stimulált tenyészetéből RNS-t izoláltunk. Az RNS-t cDNS-sé alakítottuk reverz transzkripció segítségével. A cDNS-t PCR-rel sokszoroztuk a fent említett primerek alkalmazásával. A stimulált és nem stimulált kondrocitákból származó PCR mintákat poliakrilamid gélben, szomszédos nyomásokban elektroforetizáltuk. Egy eltérően kifejeződött sávot (azaz egy olyan sávot, amely csak a stimulált sejtben található és a nem stimulált sejtben nem fejeződött ki szignifikáns vagy kimutatható szinteken) kivágtunk a gélből, klónoztuk és részlegesen szekvenáltuk. A részleges szekvenciát az 5. számú szekvencia írja le. Megállapítottuk, hogy ez a szekvencia körülbelül 60 %-os homológiát mutat egy patkány metalloproteázzal (lásd fentebb), továbbá megállapítottuk, hogy ez a szekvencia közel 85 %-ban homológ egy humán metalloproteázzal (lásd a Z48597 GenBank jegyzékszám alatt; lásd a 2. ábrát).

12. példa:

Szűrés tumorok metasztatikus potenciáljára

Rákos szövetet teszteltünk metalloproteáz gén expresszióra. A mintából kivont nukleinsavat PCR-rel sokszoroztuk a fent említett primereket alkalmazva. Az átiratok magas szintjeiből metasztatikus potenciálra lehet következtetni.

**13. példa:*****Hatóanyag szűrés expresszió inhibitorokra***

Metalloproteáz gén expresszió inhibitor jelölteket szűrtünk in vitro. Normál humán ízületi kondrociták interleukin-1-gyel stimulált tenyészetét inhibitor jelöltek hatásának tettük ki in vitro. Az RNS-t izoláltuk és reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottuk. A cDNS-t PCR-rel sokszoroztuk a fent említett primerek alkalmazásával. Az inhibitorok hatásának kitett kondrocitákat és a nem gátolt kondrocitákat egymással szomszédos nyom-sávokban poliakrilamid gélekben elektroforetizáltuk. A csökkent PCR termék szintek inhibitorra azonosítanak.

14. példa:***Hatóanyag szűrés metalloproteáz inhibitorokra***

Magának a metalloproteáznak az inhibitor jelöltjeit is szűrtük in vitro. A normál humán ízületi kondrociták interleukin-1-gyel stimulált tenyészetének felülúszóját megfelelő metalloproteáz szubsztrátumokon (például mátrix proteineken) vizsgáltuk az inhibitor jelöltek jelenlétében vagy nélkülük. Kontrollok gyanánt ismert inhibitorokat [például: 1,10-fenantrolin; beszerezhető a Sigma Co. (St.Louis) cégtől] használtunk. A szubsztrátum (például fluorogén dezintegrin metalloproteáz szubsztrátum) lebomlása inhibitorra azonosít.

15. példa:

Egy 1400 bp méretű klónt izoláltunk standard technikákkal az U-937 monocita-szerű sejtvonalból, amely egy cDNS tár. A kez-



dő szekvencia egy csonka klón, amelyből az 5' vég egy darabja hiányzik. Az 5' véget az 5' R.A.C.E. [Rapid Amplification of 5' c-DNS Ends; lásd például: „PCR Protocols, A Guide to Methods and Amplifications”, Innis et al. (szerk.); 4. fejezet, 28-38 old.; Academic Press (1990); és lásd a kiadványban lévő további referenciákat] segítségével állítottuk elő. Ismert technika alkalmazásával egy 1600 bp hosszú klónt hoztunk létre, amely a kimaradt 5' szekvenciát tartalmazta. Ez a két szekvencia együtt szolgáltatja a 8. számú szekvenciát, amelyből a peptid szekvencia származik.

16. példa:

A 9. számú szekvencia (5' -AGCCTGTGTC-3') és a 10. számú szekvencia (5' -AGCCTGTGTCTGAACCACT-3') szerinti primereket használtuk az mRNS differential display vizsgálatában (ddrd-PCR). A PCR-ben 2-5 ng sscDNS-t használtunk. A reakcióelegyet előzetesen 0,2 μ -os vékonyfalú csövekben jégen hűtöttük. Az egyes csövek a következőket tartalmazták: 50 mM trisz.HCl (pH 8,5), 50 mM kálium-klorid, 1,5 mM magnézium-klorid, 1-1 mM a dNTP-kből, 2-5 ng sscDNS, 10-10 pM a fenti primerekből, 0,5 μ l α -P³³ dCTP (10 μ Ci/ μ l; Amersham), és 20 μ l víz. Az elegyet 35 ciklusban futtatuk, ciklusonként: denaturálás (94 °C, 30 másodperc), anellálás (36 °C, 30 másodperc) és extenzió (72 °C, 1 perc). Készülék: Perkin-Elmer System 2400 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT.).

Ezzel a módszerrel az IL-1-gyel kezelt kondrociták kifejezték az ezen génhez tartozó mRNS-t, míg a kezeletlen (IL-1 nél-



kül) kontroll kondrociták nem fejeztek ki kimutatható mRNS-t.

17. példa:

Nagy teljesítményű szűréshez alkalmas vizsgálati rendszer

A dezintegrin proteáz aktivitást kinetikus enzim gátlási vizsgálatban — fluoreszcens szubsztrátumot használva — mértük. Klónozott dezintegrin enzimet és egy kis molekulatömegű fluoreszcens jelzésű protein szubsztrátumot használtunk. Az enzim aktivitást úgy határoztuk meg, hogy a szubsztrátum molekula szobahőmérsékleten való hasítása után mértük a fluoreszcenciát. Ez a vizsgálat egyszerű és nagyon könnyen automatizálható.

Standard technikákat alkalmazva, ez a vizsgálat 96 vagy 384 tartályos lemezekhez adaptálható.

Az itt leírt hivatkozásokat referenciának tekintjük.

Noha ebben a leírásban a jelen találmány speciális megvalósítási alakjai szerepelnek, a szakterületen jártas szakemberek számára azonban nyilvánvaló, hogy a találmányba különböző változtatások és módosítások vihetők be anélkül, hogy ezek a találmány szellemétől és oltalmi körétől eltérnének. Úgy gondoljuk, hogy a csatolt igénypontok minden olyan módosítást lefednek, amely a találmány oltalmi körén belül van.

**SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE**

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: TINDAL, MICHAEL H
HAQQI, TARIQ M
- (ii) TITLE OF INVENTION: USE OF A NOVEL DISINTEGRIN
METALLOPROTEASE, ITS MUTANTS, FRAGMENTS AND THE LIKE
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 11
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
 - (A) ADDRESSEE: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY
 - (B) STREET: 8700 MASON-MONTGOMERY ROAD
 - (C) CITY: MASON
 - (D) STATE: OH
 - (E) COUNTRY: USA
 - (F) ZIP: 45040-9462
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
 - (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
 - (A) APPLICATION NUMBER:
 - (B) FILING DATE:
 - (C) CLASSIFICATION:
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
 - (A) NAME: HAKE, RICHARD A.
 - (B) REGISTRATION NUMBER: 37,343
 - (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 5980&
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
 - (A) TELEPHONE: 513/622-0087
 - (B) TELEFAX: 513/622-0270

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 1824 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)



(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 2..1477

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

C	CAG	ACC	ACA	GAC	TTC	TCC	GGA	ATC	CGT	AAC	ATC	AGT	TTC	ATG	GTG		46
	Gln	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser	Gly	Ile	Arg	Asn	Ile	Ser	Phe	Met	Val		
	1				5					10					15		
AAA	CGC	ATA	AGA	ATC	AAT	ACA	ACT	GCT	GAT	GAG	AAG	GAC	CCT	ACA	AAT		94
Lys	Arg	Ile	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Ala	Asp	Glu	Lys	Asp	Pro	Thr	Asn		
				20					25					30			
CCT	TTC	CGT	TTC	CCA	AAT	ATT	AGT	GTG	GAG	AAG	TTT	CTG	GAA	TTG	AAT		142
Pro	Phe	Arg	Phe	Pro	Asn	Ile	Ser	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Glu	Leu	Asn		
			35					40					45				
TCT	GAG	CAG	AAT	CAT	GAT	GAC	TAC	TGT	TTG	GCC	TAT	GTC	TTC	ACA	GAC		190
Ser	Glu	Gln	Asn	His	Asp	Asp	Tyr	Cys	Leu	Ala	Tyr	Val	Phe	Thr	Asp		
		50					55					60					
CGA	GAT	TTT	GAT	GAT	GGC	GTA	CTT	GGT	CTG	GCT	TGG	GTT	GGA	GCA	CCT		238
Arg	Asp	Phe	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Trp	Val	Gly	Ala	Pro		
	65					70					75						
TCA	GGA	AGC	TCT	GGA	GGA	ATA	TGT	GAA	AAA	AGT	AAA	CTC	TAT	TCA	GAT		286
Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ile	Cys	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp		
	80				85				90						95		
GGT	AAG	AAG	AAG	TCC	TTA	AAC	ACT	GGA	ATT	ATT	ACT	GTT	CAG	AAC	TAT		334
Gly	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	Thr	Val	Gln	Asn	Tyr		
				100					105					110			
GGG	TCT	CAT	GTA	CCT	CCC	AAA	GTC	TCT	CAC	ATT	ACT	TTT	GCT	CAC	GAA		382
Gly	Ser	His	Val	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	His	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Glu		
			115					120					125				
GTT	GGA	CAT	AAC	TTT	GGA	TCC	CCA	CAT	GAT	TCT	GGA	ACA	GAG	TGC	ACA		430
Val	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Ser	Pro	His	Asp	Ser	Gly	Thr	Glu	Cys	Thr		
		130					135					140					
CCA	GGA	GAA	TCT	AAG	AAT	TTG	GGT	CAA	AAA	GAA	AAT	GGC	AAT	TAC	ATC		478
Pro	Gly	Glu	Ser	Lys	Asn	Leu	Gly	Gln	Lys	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Ile		
	145					150						155					
ATG	TAT	GCA	AGA	GCA	ACA	TCT	GGG	GAC	AAA	CTT	AAC	AAC	AAT	AAA	TTC		526
Met	Tyr	Ala	Arg	Ala	Thr	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Asn	Asn	Asn	Lys	Phe		
	160				165					170					175		
TCA	CTC	TGT	AGT	ATT	AGA	AAT	ATA	AGC	CAA	GTT	CTT	GAG	AAG	AAG	AGA		574
Ser	Leu	Cys	Ser	Ile	Arg	Asn	Ile	Ser	Gln	Val	Leu	Glu	Lys	Lys	Arg		
				180					185						190		



AAC	AAC	TGT	TTT	GTT	GAA	TCT	GGC	CAA	CCT	ATT	TGT	GGA	AAT	GGA	ATG	622
Asn	Asn	Cys	Phe	Val	Glu	Ser	Gly	Gln	Pro	Ile	Cys	Gly	Asn	Gly	Met	
			195					200					205			
GTA	GAA	CAA	GGT	GAA	GAA	TGT	GAT	TGT	GGC	TAT	AGT	GAC	CAG	TGT	AAA	670
Val	Glu	Gln	Gly	Glu	Glu	Cys	Asp	Cys	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gln	Cys	Lys	
		210					215					220				
GAT	GAA	TGC	TGC	TTC	GAT	GCA	AAT	CAA	CCA	GAG	GGA	AGA	AAA	TGC	AAA	718
Asp	Glu	Cys	Cys	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln	Pro	Glu	Gly	Arg	Lys	Cys	Lys	
	225					230						235				
CTG	AAA	CCT	GGG	AAA	CAG	TGC	AGT	CCA	AGT	CAA	GGT	CCT	TGT	TGT	ACA	766
Leu	Lys	Pro	Gly	Lys	Gln	Cys	Ser	Pro	Ser	Gln	Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	
240					245					250					255	
GCA	CAG	TGT	GCA	TTC	AAG	TCA	AAG	TCT	GAG	AAG	TGT	CGG	GAT	GAT	TCA	814
Ala	Gln	Cys	Ala	Phe	Lys	Ser	Lys	Ser	Glu	Lys	Cys	Arg	Asp	Asp	Ser	
				260					265					270		
GAC	TGT	GCA	AGG	GAA	GGA	ATA	TGT	AAT	GGC	TTC	ACA	GCT	CTC	TGC	CCA	862
Asp	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Cys	Asn	Gly	Phe	Thr	Ala	Leu	Cys	Pro	
			275					280					285			
GCA	TCT	GAC	CCT	AAA	CCA	AAC	TTC	ACA	GAC	TGT	AAT	AGG	CAT	ACA	CAA	910
Ala	Ser	Asp	Pro	Lys	Pro	Asn	Phe	Thr	Asp	Cys	Asn	Arg	His	Thr	Gln	
		290					295					300				
GTG	TGC	ATT	AAT	GGG	CAA	TGT	GCA	GGT	TCT	ATC	TGT	GAG	AAA	TAT	GGC	958
Val	Cys	Ile	Asn	Gly	Gln	Cys	Ala	Gly	Ser	Ile	Cys	Glu	Lys	Tyr	Gly	
	305					310						315				
TTA	GAG	GAG	TGT	ACG	TGT	GCC	AGT	TCT	GAT	GGC	AAA	GAT	GAT	AAA	GAA	1006
Leu	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Lys	Asp	Asp	Lys	Glu	
320					325					330					335	
TTA	TGC	CAT	GTA	TGC	TGT	ATG	AAG	AAA	ATG	GAC	CCA	TCA	ACT	TGT	GCC	1054
Leu	Cys	His	Val	Cys	Cys	Met	Lys	Lys	Met	Asp	Pro	Ser	Thr	Cys	Ala	
				340					345					350		
AGT	ACA	GGG	TCT	GTG	CAG	TGG	AGT	AGG	CAC	TTC	AGT	GGT	CGA	ACC	ATC	1102
Ser	Thr	Gly	Ser	Val	Gln	Trp	Ser	Arg	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Thr	Ile	
			355					360					365			
ACC	CTG	CAA	CCT	GGA	TCC	CCT	TGC	AAC	GAT	TTT	AGA	GGT	TAC	TGT	GAT	1150
Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Ser	Pro	Cys	Asn	Asp	Phe	Arg	Gly	Tyr	Cys	Asp	
		370					375					380				
GTT	TTC	ATG	CGG	TGC	AGA	TTA	GTA	GAT	GCT	GAT	GGT	CCT	CTA	GCT	AGG	1198
Val	Phe	Met	Arg	Cys	Arg	Leu	Val	Asp	Ala	Asp	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	
	385					390					395					



CTT AAA AAA GCA ATT TTT AGT CCA GAG CTC TAT GAA AAC ATT GCT GAA 1246
 Leu Lys Lys Ala Ile Phe Ser Pro Glu Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Glu
 400 405 410 415

TGG ATT GTG GCT CAT TGG TGG GCA GTA TTA CTT ATG GGA ATT GCT CTG 1294
 Trp Ile Val Ala His Trp Trp Ala Val Leu Leu Met Gly Ile Ala Leu
 420 425 430

ATC ATG CTA ATG GCT GGA TTT ATT AAG ATA TGC AGT GTT CAT ACT CCA 1342
 Ile Met Leu Met Ala Gly Phe Ile Lys Ile Cys Ser Val His Thr Pro
 435 440 445

AGT AGT AAT CCA AAG TTG CCT CCT CCT AAA CCA CTT CCA GGC ACT TTA 1390
 Ser Ser Asn Pro Lys Leu Pro Pro Pro Lys Pro Leu Pro Gly Thr Leu
 450 455 460

AAG AGG AGG AGA CCT CCA CAG CCC ATT CAG CAA CCC CAG CGT CAG CGG 1438
 Lys Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Ile Gln Gln Pro Gln Arg Gln Arg
 465 470 475

CCC CGA GAG AGT TAT CAA ATG GGA CAC ATG AGA CGC TAA CTGCAGCTTT 1487
 Pro Arg Glu Ser Tyr Gln Met Gly His Met Arg Arg *

480 485 490

TGCCTTGGTT CTTCTAGTG CCTACAATGG GAAACTTCA CTCAAAGAG AAACCTATTA 1547

AGTCATCATC TCCAACTAA ACCCTCACAA GTAACAGTTG AAGAAAAAAT GGCAAGAGAT 1607

CATATCCTCA GACCAGGTGG AATTACTTAA ATTTTAAAGC CTGAAAATTC CAATTTGGGG 1667

GTGGGAGGTG GAAAAGGAAC CCAATTTTCT TATGAACAGA TATTTTAAAC TTAATGGCAC 1727

AAAGTCTTAG AATATTATTA TGTGCCCCGT GTTCCCTGTT CTCGTTGCT GCATTTTCTT 1787

CACTTGCAGG CAAACTTGGC TCTCAATAAA CTTTTCG 1824

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 492 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Gln Thr Thr Asp Phe Ser Gly Ile Arg Asn Ile Ser Phe Met Val Lys
 1 5 10 15

Arg Ile Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asp Glu Lys Asp Pro Thr Asn Pro
 20 25 30



TCC	TGG	GCG	GCG	GGG	ATG	GGA	GGT	CAG	TAT	GGG	AAT	CCT	TTA	AAT	AAA	97
Ser	Trp	Ala	Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Gln	Tyr	Gly	Asn	Pro	Leu	Asn	Lys	
	505					510					515					
TAT	ATC	AGA	CAT	TAT	GAA	GGA	TTA	TCT	TAC	AAT	GTG	GAT	TCA	TTA	CAC	145
Tyr	Ile	Arg	His	Tyr	Glu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asn	Val	Asp	Ser	Leu	His	
520					525					530					535	
CAA	AAA	CAC	CAG	CGT	GCC	AAA	AGA	GCA	GTC	TCA	CAT	GAA	GAC	CAA	TTT	193
Gln	Lys	His	Gln	Arg	Ala	Lys	Arg	Ala	Val	Ser	His	Glu	Asp	Gln	Phe	
				540					545					550		
TTA	CGT	CTA	GAT	TTC	CAT	GCC	CAT	GGA	AGA	CAT	TTC	AAC	CTA	CGA	ATG	241
Leu	Arg	Leu	Asp	Phe	His	Ala	His	Gly	Arg	His	Phe	Asn	Leu	Arg	Met	
			555					560					565			
AAG	AGG	GAC	ACT	TCC	CTT	TTC	AGT	GAT	GAA	TTT	AAA	GTA	GAA	ACA	TCA	289
Lys	Arg	Asp	Thr	Ser	Leu	Phe	Ser	Asp	Glu	Phe	Lys	Val	Glu	Thr	Ser	
		570					575					580				
AAT	AAA	GTA	CTT	GAT	TAT	GAT	ACC	TCT	CAT	ATT	TAC	ACT	GGA	CAT	ATT	337
Asn	Lys	Val	Leu	Asp	Tyr	Asp	Thr	Ser	His	Ile	Tyr	Thr	Gly	His	Ile	
	585					590					595					
TAT	GGT	GAA	GAA	GGA	AGT	TTT	AGC	CAT	GGG	TCT	GTT	ATT	GAT	GGA	AGA	385
Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Ser	His	Gly	Ser	Val	Ile	Asp	Gly	Arg	
600					605					610					615	
TTT	GAA	GGA	TTC	ATC	CAG	ACT	CGT	GGT	GGC	ACA	TTT	TAT	GTT	GAG	CCA	433
Phe	Glu	Gly	Phe	Ile	Gln	Thr	Arg	Gly	Gly	Thr	Phe	Tyr	Val	Glu	Pro	
				620					625					630		
GCA	GAG	AGA	TAT	ATT	AAA	GAC	CGA	ACT	CTG	CCA	TTT	CAC	TCT	GTC	ATT	481
Ala	Glu	Arg	Tyr	Ile	Lys	Asp	Arg	Thr	Leu	Pro	Phe	His	Ser	Val	Ile	
			635					640						645		
TAT	CAT	GAA	GAT	GAT	ATT	AGT	GAA	AGG	CTT	AAA	CTG	AGG	CTT	AGA	AAA	529
Tyr	His	Glu	Asp	Asp	Ile	Ser	Glu	Arg	Leu	Lys	Leu	Arg	Leu	Arg	Lys	
		650					655					660				
CTT	ATG	TCA	CTT	GAG	TTG	TGG	ACC	TCC	TGT	TGT	TTA	CCC	TGT	GCT	CTT	577
Leu	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Trp	Thr	Ser	Cys	Cys	Leu	Pro	Cys	Ala	Leu	
	665					670						675				
CTG	CTT	CAC	TCA	TGG	AAG	AAA	GCT	GTA	AAT	TCT	CAC	TGC	CTT	TAC	TTC	625
Leu	Leu	His	Ser	Trp	Lys	Lys	Ala	Val	Asn	Ser	His	Cys	Leu	Tyr	Phe	
680					685					690					695	
AAG	GAT	TTC	TGG	GGC	TTT	TCT	GAA	ATC	TAC	TAT	CCC	CAT	AAA	TAC	GGT	673
Lys	Asp	Phe	Trp	Gly	Phe	Ser	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Pro	His	Lys	Tyr	Gly	
				700					705					710		
CCT	CAG	GGC	GGC	TGT	GCA	GAT	CAT	TCA	GTA	TTT	GAA	AGA	ATG	AGG	AAA	721
Pro	Gln	Gly	Gly	Cys	Ala	Asp	His	Ser	Val	Phe	Glu	Arg	Met	Arg	Lys	
			715					720						725		



TAC	CAG	ATG	ACT	GGT	GTA	GAG	GAA	GTA	ACA	CAG	ATA	CCT	CAA	GAA	GAA	769
Tyr	Gln	Met	Thr	Gly	Val	Glu	Glu	Val	Thr	Gln	Ile	Pro	Gln	Glu	Glu	
		730					735					740				
CAT	GCT	GCT	AAT	GGT	CCA	GAA	CTT	CTG	AGG	AAA	AGA	CGT	ACA	ACT	TCA	817
His	Ala	Ala	Asn	Gly	Pro	Glu	Leu	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Thr	Thr	Ser	
	745					750				755						
GCT	GAA	AAA	AAT	ACT	TGT	CAG	CTT	TAT	ATT	CAG	ACT	GAT	CAT	TTG	TTC	865
Ala	Glu	Lys	Asn	Thr	Cys	Gln	Leu	Tyr	Ile	Gln	Thr	Asp	His	Leu	Phe	
760					765					770				775		
TTT	AAA	TAT	TAC	GGA	ACA	CGA	GAA	GCT	GTG	ATT	GCC	CAG	ATA	TCC	AGT	913
Phe	Lys	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Arg	Glu	Ala	Val	Ile	Ala	Gln	Ile	Ser	Ser	
				780					785					790		
CAT	GTT	AAA	GCG	ATT	GAT	ACA	ATT	TAC	CAG	ACC	ACA	GAC	TTC	TCC	GGA	961
His	Val	Lys	Ala	Ile	Asp	Thr	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser	Gly	
			795					800					805			
ATC	CGT	AAC	ATC	AGT	TTC	ATG	GTG	AAA	CGC	ATA	AGA	ATC	AAT	ACA	ACT	1009
Ile	Arg	Asn	Ile	Ser	Phe	Met	Val	Lys	Arg	Ile	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	
		810					815					820				
GCT	GAT	GAG	AAG	GAC	CCT	ACA	AAT	CCT	TTC	CGT	TTC	CCA	AAT	ATT	AGT	1057
Ala	Asp	Glu	Lys	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Phe	Arg	Phe	Pro	Asn	Ile	Ser	
	825					830					835					
GTG	GAG	AAG	TTT	CTG	GAA	TTG	AAT	TCT	GAG	CAG	AAT	CAT	GAT	GAC	TAC	1105
Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Gln	Asn	His	Asp	Asp	Tyr	
840					845					850				855		
TGT	TTG	GCC	TAT	GTC	TTC	ACA	GAC	CGA	GAT	TTT	GAT	GAT	GGC	GTA	CTT	1153
Cys	Leu	Ala	Tyr	Val	Phe	Thr	Asp	Arg	Asp	Phe	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	
				860					865					870		
GGT	CTG	GCT	TGG	GTT	GGA	GCA	CCT	TCA	GGA	AGC	TCT	GGA	GGA	ATA	TGT	1201
Gly	Leu	Ala	Trp	Val	Gly	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ile	Cys	
			875					880					885			
GAA	AAA	AGT	AAA	CTC	TAT	TCA	GAT	GGT	AAG	AAG	AAG	TCC	TTA	AAC	ACT	1249
Glu	Lys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Gly	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	
		890					895					900				
GGA	ATT	ATT	ACT	GTT	CAG	AAC	TAT	GGG	TCT	CAT	GTA	CCT	CCC	AAA	GTC	1297
Gly	Ile	Ile	Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Gly	Ser	His	Val	Pro	Pro	Lys	Val	
	905					910						915				
TCT	CAC	ATT	ACT	TTT	GCT	CAC	GAA	GTT	GGA	CAT	AAC	TTT	GGA	TCC	CCA	1345
Ser	His	Ile	Thr	Phe	Ala	His	Glu	Val	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Ser	Pro	
					925					930					935	
CAT	GAT	TCT	GGA	ACA	GAG	TGC	ACA	CCA	GGA	GAA	TCT	AAG	AAT	TTG	GGT	1393
His	Asp	Ser	Gly	Thr	Glu	Cys	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Lys	Asn	Leu	Gly	
				940					945					950		



CAA AAA GAA AAT GGC AAT TAC ATC ATG TAT GCA AGA GCA ACA TCT GGG	1441
Gln Lys Glu Asn Gly Asn Tyr Ile Met Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly	
955 960 965	
GAC AAA CTT AAC AAC AAT AAA TTC TCA CTC TGT AGT ATT AGA AAT ATA	1489
Asp Lys Leu Asn Asn Asn Lys Phe Ser Leu Cys Ser Ile Arg Asn Ile	
970 975 980	
AGC CAA GTT CTT GAG AAG AAG AGA AAC AAC TGT TTT GTT GAA TCT GGC	1537
Ser Gln Val Leu Glu Lys Lys Arg Asn Asn Cys Phe Val Glu Ser Gly	
985 990 995	
CAA CCT ATT TGT GGA AAT GGA ATG GTA GAA CAA GGT GAA GAA TGT GAT	1585
Gln Pro Ile Cys Gly Asn Gly Met Val Glu Gln Gly Glu Glu Cys Asp	
1000 1005 1010 1015	
TGT GGC TAT AGT GAC CAG TGT AAA GAT GAA TGC TGC TTC GAT GCA AAT	1633
Cys Gly Tyr Ser Asp Gln Cys Lys Asp Glu Cys Cys Phe Asp Ala Asn	
1020 1025 1030	
CAA CCA GAG GGA AGA AAA TGC AAA CTG AAA CCT GGG AAA CAG TGC AGT	1681
Gln Pro Glu Gly Arg Lys Cys Lys Leu Lys Pro Gly Lys Gln Cys Ser	
1035 1040 1045	
CCA AGT CAA GGT CCT TGT TGT ACA GCA CAG TGT GCA TTC AAG TCA AAG	1729
Pro Ser Gln Gly Pro Cys Cys Thr Ala Gln Cys Ala Phe Lys Ser Lys	
1050 1055 1060	
TCT GAG AAG TGT CGG GAT GAT TCA GAC TGT GCA AGG GAA GGA ATA TGT	1777
Ser Glu Lys Cys Arg Asp Asp Ser Asp Cys Ala Arg Glu Gly Ile Cys	
1065 1070 1075	
AAT GGC TTC ACA GCT CTC TGC CCA GCA TCT GAC CCT AAA CCA AAC TTC	1825
Asn Gly Phe Thr Ala Leu Cys Pro Ala Ser Asp Pro Lys Pro Asn Phe	
1080 1085 1090 1095	
ACA GAC TGT AAT AGG CAT ACA CAA GTG TGC ATT AAT GGG CAA TGT GCA	1873
Thr Asp Cys Asn Arg His Thr Gln Val Cys Ile Asn Gly Gln Cys Ala	
1100 1105 1110	
GGT TCT ATC TGT GAG AAA TAT GGC TTA GAG GAG TGT ACG TGT GCC AGT	1921
Gly Ser Ile Cys Glu Lys Tyr Gly Leu Glu Glu Cys Thr Cys Ala Ser	
1115 1120 1125	
TCT GAT GGC AAA GAT GAT AAA GAA TTA TGC CAT GTA TGC TGT ATG AAG	1969
Ser Asp Gly Lys Asp Asp Lys Glu Leu Cys His Val Cys Cys Met Lys	
1130 1135 1140	
AAA ATG GAC CCA TCA ACT TGT GCC AGT ACA GGG TCT GTG CAG TGG AGT	2017
Lys Met Asp Pro Ser Thr Cys Ala Ser Thr Gly Ser Val Gln Trp Ser	
1145 1150 1155	
AGG CAC TTC AGT GGT CGA ACC ATC ACC CTG CAA CCT GGA TCC CCT TGC	2065
Arg His Phe Ser Gly Arg Thr Ile Thr Leu Gln Pro Gly Ser Pro Cys	
1160 1165 1170 1175	



AAC GAT TTT AGA GGT TAC TGT GAT GTT TTC ATG CGG TGC AGA TTA GTA	2113
Asn Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Asp Val Phe Met Arg Cys Arg Leu Val	
1180 1185 1190	
GAT GCT GAT GGT CCT CTA GCT AGG CTT AAA AAA GCA ATT TTT AGT CCA	2161
Asp Ala Asp Gly Pro Leu Ala Arg Leu Lys Lys Ala Ile Phe Ser Pro	
1195 1200 1205	
GAG CTC TAT GAA AAC ATT GCT GAA TGG ATT GTG GCT CAT TGG TGG GCA	2209
Glu Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Glu Trp Ile Val Ala His Trp Trp Ala	
1210 1215 1220	
GTA TTA CTT ATG GGA ATT GCT CTG ATC ATG CTA ATG GCT GGA TTT ATT	2257
Val Leu Leu Met Gly Ile Ala Leu Ile Met Leu Met Ala Gly Phe Ile	
1225 1230 1235	
AAG ATA TGC AGT GTT CAT ACT CCA AGT AGT AAT CCA AAG TTG CCT CCT	2305
Lys Ile Cys Ser Val His Thr Pro Ser Ser Asn Pro Lys Leu Pro Pro	
1240 1245 1250 1255	
CCT AAA CCA CTT CCA GGC ACT TTA AAG AGG AGG AGA CCT CCA CAG CCC	2353
Pro Lys Pro Leu Pro Gly Thr Leu Lys Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro	
1260 1265 1270	
ATT CAG CAA CCC CAG CGT CAG CGG CCC CGA GAG AGT TAT CAA ATG GGA	2401
Ile Gln Gln Pro Gln Arg Gln Arg Pro Arg Glu Ser Tyr Gln Met Gly	
1275 1280 1285	
CAC ATG AGA CGC T AACTGCAGCT TTTGCCTTGG TTCTTCCTAG TGCCTACAAT	2454
His Met Arg Arg	
1290	
GGGAAACTT CACTCCAAAG AGAAACCTAT TAAGTCATCA TCTCCAAACT AAACCCTCAC	2514
AAGTAACAGT TGAAGAAAA ATGGCAAGAG ATCATATCCT CAGACCAGGT GGAATTACTT	2574
AAATTTTAAA GCCTGAAAAT TCCAATTTGG GGGTGGGAGG TGGAAAAGGA ACCCAATTTT	2634
CTTATGAACA GATATTTTAA ACTTAATGGC ACAAAGTCTT AGAATATTAT TATGTGCCCC	2694
GTGTTCCCTG TTCTTCGTTG CTGCATTTTC TTCACTTGCA GGCAAACCTTG GCTCTCAATA	2754
AACTTTTCG	2763

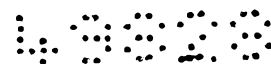
(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 799 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:



Met Val Leu Leu Arg Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser Trp Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Met Gly Gly Gln Tyr Gly Asn Pro Leu Asn Lys Tyr Ile Arg His Tyr
 20 25 30
 Glu Gly Leu Ser Tyr Asn Val Asp Ser Leu His Gln Lys His Gln Arg
 35 40 45
 Ala Lys Arg Ala Val Ser His Glu Asp Gln Phe Leu Arg Leu Asp Phe
 50 55 60
 His Ala His Gly Arg His Phe Asn Leu Arg Met Lys Arg Asp Thr Ser
 65 70 75 80
 Leu Phe Ser Asp Glu Phe Lys Val Glu Thr Ser Asn Lys Val Leu Asp
 85 90 95
 Tyr Asp Thr Ser His Ile Tyr Thr Gly His Ile Tyr Gly Glu Glu Gly
 100 105 110
 Ser Phe Ser His Gly Ser Val Ile Asp Gly Arg Phe Glu Gly Phe Ile
 115 120 125
 Gln Thr Arg Gly Gly Thr Phe Tyr Val Glu Pro Ala Glu Arg Tyr Ile
 130 135 140
 Lys Asp Arg Thr Leu Pro Phe His Ser Val Ile Tyr His Glu Asp Asp
 145 150 155 160
 Ile Ser Glu Arg Leu Lys Leu Arg Leu Arg Lys Leu Met Ser Leu Glu
 165 170 175
 Leu Trp Thr Ser Cys Cys Leu Pro Cys Ala Leu Leu Leu His Ser Trp
 180 185 190
 Lys Lys Ala Val Asn Ser His Cys Leu Tyr Phe Lys Asp Phe Trp Gly
 195 200 205
 Phe Ser Glu Ile Tyr Tyr Pro His Lys Tyr Gly Pro Gln Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Asp His Ser Val Phe Glu Arg Met Arg Lys Tyr Gln Met Thr Gly
 225 230 235 240
 Val Glu Glu Val Thr Gln Ile Pro Gln Glu Glu His Ala Ala Asn Gly
 245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Arg Lys Arg Arg Thr Thr Ser Ala Glu Lys Asn Thr
 260 265 270
 Cys Gln Leu Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe Lys Tyr Tyr Gly
 275 280 285
 Thr Arg Glu Ala Val Ile Ala Gln Ile Ser Ser His Val Lys Ala Ile
 290 295 300



Asp 305	Thr	Ile	Tyr	Gln	Thr 310	Thr	Asp	Phe	Ser	Gly 315	Ile	Arg	Asn	Ile	Ser 320
Phe	Met	Val	Lys	Arg 325	Ile	Arg	Ile	Asn	Thr 330	Thr	Ala	Asp	Glu	Lys 335	Asp
Pro	Thr	Asn	Pro 340	Phe	Arg	Phe	Pro	Asn 345	Ile	Ser	Val	Glu	Lys 350	Phe	Leu
Glu	Leu	Asn 355	Ser	Glu	Gln	Asn	His 360	Asp	Asp	Tyr	Cys	Leu 365	Ala	Tyr	Val
Phe	Thr 370	Asp	Arg	Asp	Phe	Asp 375	Asp	Gly	Val	Leu	Gly 380	Leu	Ala	Trp	Val
Gly 385	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser 390	Ser	Gly	Gly	Ile	Cys 395	Glu	Lys	Ser	Lys	Leu 400
Tyr	Ser	Asp	Gly	Lys 405	Lys	Lys	Ser	Leu	Asn 410	Thr	Gly	Ile	Ile	Thr 415	Val
Gln	Asn	Tyr	Gly 420	Ser	His	Val	Pro	Pro 425	Lys	Val	Ser	His	Ile 430	Thr	Phe
Ala	His	Glu 435	Val	Gly	His	Asn	Phe 440	Gly	Ser	Pro	His	Asp 445	Ser	Gly	Thr
Glu	Cys 450	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser 455	Lys	Asn	Leu	Gly	Gln 460	Lys	Glu	Asn	Gly
Asn 465	Tyr	Ile	Met	Tyr	Ala 470	Arg	Ala	Thr	Ser	Gly 475	Asp	Lys	Leu	Asn 480	Asn
Asn	Lys	Phe	Ser	Leu 485	Cys	Ser	Ile	Arg	Asn 490	Ile	Ser	Gln	Val	Leu 495	Glu
Lys	Lys	Arg	Asn 500	Asn	Cys	Phe	Val	Glu 505	Ser	Gly	Gln	Pro	Ile 510	Cys	Gly
Asn	Gly 515	Met	Val	Glu	Gln	Gly 520	Glu	Glu	Cys	Asp	Cys	Gly 525	Tyr	Ser	Asp
Gln 530	Cys	Lys	Asp	Glu	Cys 535	Cys	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln 540	Pro	Glu	Gly	Arg
Lys 545	Cys	Lys	Leu	Lys 550	Pro	Gly	Lys	Gln	Cys 555	Ser	Pro	Ser	Gln	Gly	Pro 560
Cys	Cys	Thr	Ala 565	Gln	Cys	Ala	Phe	Lys 570	Ser	Lys	Ser	Glu	Lys	Cys 575	Arg
Asp	Asp	Ser	Asp 580	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly 585	Ile	Cys	Asn	Gly	Phe 590	Thr	Ala
Leu	Cys 595	Pro	Ala	Ser	Asp	Pro	Lys 600	Pro	Asn	Phe	Thr	Asp 605	Cys	Asn	Arg



His	Thr	Gln	Val	Cys	Ile	Asn	Gly	Gln	Cys	Ala	Gly	Ser	Ile	Cys	Glu
	610					615					620				
Lys	Tyr	Gly	Leu	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys	Ala	Ser	Ser	Asp	Gly	Lys	Asp
625				630					635						640
Asp	Lys	Glu	Leu	Cys	His	Val	Cys	Cys	Met	Lys	Lys	Met	Asp	Pro	Ser
				645					650					655	
Thr	Cys	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Val	Gln	Trp	Ser	Arg	His	Phe	Ser	Gly
			660					665					670		
Arg	Thr	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Ser	Pro	Cys	Asn	Asp	Phe	Arg	Gly
		675					680					685			
Tyr	Cys	Asp	Val	Phe	Met	Arg	Cys	Arg	Leu	Val	Asp	Ala	Asp	Gly	Pro
	690					695					700				
Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Lys	Ala	Ile	Phe	Ser	Pro	Glu	Leu	Tyr	Glu	Asn
705					710					715					720
Ile	Ala	Glu	Trp	Ile	Val	Ala	His	Trp	Trp	Ala	Val	Leu	Leu	Met	Gly
				725					730					735	
Ile	Ala	Leu	Ile	Met	Leu	Met	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Ile	Cys	Ser	Val
			740					745					750		
His	Thr	Pro	Ser	Ser	Asn	Pro	Lys	Leu	Pro	Pro	Pro	Lys	Pro	Leu	Pro
		755					760					765			
Gly	Thr	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Pro	Ile	Gln	Gln	Pro	Gln
	770					775					780				
Arg	Gln	Arg	Pro	Arg	Glu	Ser	Tyr	Gln	Met	Gly	His	Met	Arg	Arg	
785					790					795					

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 239 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iv) ANTI-SENSE: YES

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

AATACCACCA TTCTCTGTTA TCCTGAGTAT GTCAATTAAA CAGTAATTTT TAATTAAGAG

60



CGGAAAATT TTATAATACA AAGAAACATC CATATTGCAA TTTCTGTTTA CAATTGCACA 120
 CAGAAGTACA GTGTACGTAA GAAATACATG TCTGCATATA ACAAGGTATG TACATTGGCA 180
 AGTGATGTCT CCAATGTTGA GGTGGTCGAG CCTCCTAGCC TTGATTGGCA GTTGAAAAA 239

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 239 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

TTTTTCAACT GCCAATCAAG GCTAGGAGGC TCGACCACCT CAACATTGGA GACATCACTT 60
 GCCAATGTAC ATACCTTGTT ATATGCAGAC ATGTATTTCT TACGTACACT GTACTTCTGT 120
 GTGCAATTGT AAACAGAAAT TGCAATATGG ATGTTTCTTT GTATTATAAA ATTTTCCGC 180
 TCTTAATTAA AAATTACTGT TTAATTGACA TACTCAGGAT AACAGAGAAT GGTGGTATT 239

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 736 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

AACCACTTCC AGGCACTTTA AAGAGGAGGA GACCTCCACA GCCCATTGAG CAACCCAGC 60
 GTCAGCGGCC CCGAGAGAGT TATCAAATGG GACACATGAG ACGCTAACTG CAGCTTTTGC 120
 CTTGGTTCTT CCTAGTGCCT ACAATGGGAA AACTTCACTC CAAAGAGAAA CCTATTAAGT 180
 CATCATCTCC AAATAAACC CTCACAAGTA ACAGTTGAAG AAAAAATGGC AAGAGATCAT 240
 ATCCTCAGAC CAGGTGGAAT TACTTAAATT TTAAAGCCTG AAAATTCCAA TTTGGGGGTG 300



GGAGGTGGAA AAGGAACCCA ATTTTCTTAT GAACAGATAT TTTTAACTTA ATGGCACAAA 360
 GTCTTAGAAT ATTATTATGT GCCCCGTGTT CCCTGTTCTT CGTTGCTGCA TTTTCTTCAC 420
 TTGCAGGCAA ACTTGGCTCT CAATAAACTT TTACCACAAA TTGAAATAAA TATATTTTTT 480
 TCAACTGCCA ATCAAGGCTA GGAGGCTCGA CCACCTCAAC ATTGGAGACA ATCACTTGCC 540
 AATGTACATA CCTTGTTATA TGCAGACATG TATTTCTTAC GTACACTGTA CTTCTGTGTG 600
 CAATTGTAAA CAGAAATTGC AATATGGATG TTTCTTTGTA TTATAAAATT TTTCCGCTCT 660
 TAATTA AAAA T TACTGTTTA ATTGACATAC TCAGGATAAC AGAGAATGGT GGTATTCAGT 720
 GGTT CAGACA CAGGCT 736

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2625 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 17..2263

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

GGCGGCGGCA CGGAAG ATG GTG TTG CTG AGA GTG TTA ATT CTG CTC CTC 49
 Met Val Leu Leu Arg Val Leu Ile Leu Leu Leu
 800 805 810

TCC TGG GCG GCG GGG ATG GGA GGT CAG TAT GGG AAT CCT TTA AAT AAA 97
 Ser Trp Ala Ala Gly Met Gly Gly Gln Tyr Gly Asn Pro Leu Asn Lys
 815 820 825

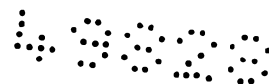
TAT ATC AGA CAT TAT GAA GGA TTA TCT TAC AAT GTG GAT TCA TTA CAC 145
 Tyr Ile Arg His Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Asn Val Asp Ser Leu His
 830 835 840

CAA AAA CAC CAG CGT GCC AAA AGA GCA GTC TCA CAT GAA GAC CAA TTT 193
 Gln Lys His Gln Arg Ala Lys Arg Ala Val Ser His Glu Asp Gln Phe
 845 850 855

TTA CGT CTA GAT TTC CAT GCC CAT GGA AGA CAT TTC AAC CTA CGA ATG 241
 Leu Arg Leu Asp Phe His Ala His Gly Arg His Phe Asn Leu Arg Met
 860 865 870



AAG Lys 875	AGG Arg	GAC Asp	ACT Thr	TCC Ser	CTT Leu	TTC Phe	AGT Ser	GAT Asp	GAA Glu	TTT Phe	AAA Lys	GTA Val	GAA Glu	ACA Thr	TCA Ser	289
AAT Asn	AAA Lys	GTA Val	CTT Leu	GAT Asp	TAT Tyr	GAT Asp	ACC Thr	TCT Ser	CAT His	ATT Ile	TAC Tyr	ACT Thr	GGA Gly	CAT His	ATT Ile	337
TAT Tyr	GGT Gly	GAA Glu	GAA Glu	GGA Gly	AGT Ser	TTT Phe	AGC Ser	CAT His	GGG Gly	TCT Ser	GTT Val	ATT Ile	GAT Asp	GGA Gly	AGA Arg	385
TTT Phe	GAA Glu	GGA Gly	TTC Phe	ATC Ile	CAG Gln	ACT Thr	CGT Arg	GGT Gly	GGC Gly	ACA Thr	TTT Phe	TAT Tyr	GTT Val	GAG Glu	CCA Pro	433
GCA Ala	GAG Glu	AGA Arg	TAT Tyr	ATT Ile	AAA Lys	GAC Asp	CGA Arg	ACT Thr	CTG Leu	CCA Pro	TTT Phe	CAC His	TCT Ser	GTC Val	ATT Ile	481
TAT Tyr	CAT His	GAA Glu	GAT Asp	GAT Asp	ATT Ile	AAC Asn	TAT Tyr	CCC Pro	CAT His	AAA Lys	TAC Tyr	GGT Gly	CCT Pro	CAG Gln	GGC Gly	529
GGC Gly	TGT Cys	GCA Ala	GAT Asp	CAT His	TCA Ser	GTA Val	TTT Phe	GAA Glu	AGA Arg	ATG Met	AGG Arg	AAA Lys	TAC Tyr	CAG Gln	ATG Met	577
ACT Thr	GGT Gly	GTA Val	GAG Glu	GAA Glu	GTA Val	ACA Thr	CAG Gln	ATA Ile	CCT Pro	CAA Gln	GAA Glu	GAA Glu	CAT His	GCT Ala	GCT Ala	625
AAT Asn	GGT Gly	CCA Pro	GAA Glu	CTT Leu	CTG Leu	AGG Arg	AAA Lys	AGA Arg	CGT Arg	ACA Thr	ACT Thr	TCA Ser	GCT Ala	GAA Glu	AAA Lys	673
AAT Asn	ACT Thr	TGT Cys	CAG Gln	CTT Leu	TAT Tyr	ATT Ile	CAG Gln	ACT Thr	GAT Asp	CAT His	TTG Leu	TTC Phe	TTT Phe	AAA Lys	TAT Tyr	721
TAC Tyr	GGA Gly	ACA Thr	CGA Arg	GAA Glu	GCT Ala	GTG Val	ATT Ile	GCC Ala	CAG Gln	ATA Ile	TCC Ser	AGT Ser	CAT His	GTT Val	AAA Lys	769
GCG Ala	ATT Ile	GAT Asp	ACA Thr	ATT Ile	TAC Tyr	CAG Gln	ACC Thr	ACA Thr	GAC Asp	TTC Phe	TCC Ser	GGA Gly	ATC Ile	CGT Arg	AAC Asn	817
ATC Ile	AGT Ser	TTC Phe	ATG Met	GTG Val	AAA Lys	CGC Arg	ATA Ile	AGA Arg	ATC Ile	AAT Asn	ACA Thr	ACT Thr	GCT Ala	GAT Asp	GAG Glu	865
AAG Lys	GAC Asp	CCT Pro	ACA Thr	AAT Asn	CCT Pro	TTC Phe	CGT Arg	TTC Phe	CCA Pro	AAT Asn	ATT Ile	AGT Ser	GTG Val	GAG Glu	AAG Lys	913



TTT	CTG	GAA	TTG	AAT	TCT	GAG	CAG	AAT	CAT	GAT	GAC	TAC	TGT	TTG	GCC	961
Phe	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Gln	Asn	His	Asp	Asp	Tyr	Cys	Leu	Ala	
	1100					1105					1110					
TAT	GTC	TTC	ACA	GAC	CGA	GAT	TTT	GAT	GAT	GGC	GTA	CTT	GGT	CTG	GCT	1009
Tyr	Val	Phe	Thr	Asp	Arg	Asp	Phe	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	
	1115				1120					1125					1130	
TGG	GTT	GGA	GCA	CCT	TCA	GGA	AGC	TCT	GGA	GGA	ATA	TGT	GAA	AAA	AGT	1057
Trp	Val	Gly	Ala	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ile	Cys	Glu	Lys	Ser	
				1135					1140					1145		
AAA	CTC	TAT	TCA	GAT	GGT	AAG	AAG	AAG	TCC	TTA	AAC	ACT	GGA	ATT	ATT	1105
Lys	Leu	Tyr	Ser	Asp	Gly	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile	
			1150					1155					1160			
ACT	GTT	CAG	AAC	TAT	GGG	TCT	CAT	GTA	CCT	CCC	AAA	GTC	TCT	CAC	ATT	1153
Thr	Val	Gln	Asn	Tyr	Gly	Ser	His	Val	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	His	Ile	
		1165					1170					1175				
ACT	TTT	GCT	CAC	GAA	GTT	GGA	CAT	AAC	TTT	GGA	TCC	CCA	CAT	GAT	TCT	1201
Thr	Phe	Ala	His	Glu	Val	Gly	His	Asn	Phe	Gly	Ser	Pro	His	Asp	Ser	
	1180					1185					1190					
GGA	ACA	GAG	TGC	ACA	CCA	GGA	GAA	TCT	AAG	AAT	TTG	GGT	CAA	AAA	GAA	1249
Gly	Thr	Glu	Cys	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Lys	Asn	Leu	Gly	Gln	Lys	Glu	
	1195				1200				1205						1210	
AAT	GGC	AAT	TAC	ATC	ATG	TAT	GCA	AGA	GCA	ACA	TCT	GGG	GAC	AAA	CTT	1297
Asn	Gly	Asn	Tyr	Ile	Met	Tyr	Ala	Arg	Ala	Thr	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	
				1215				1220						1225		
AAC	AAC	AAT	AAA	TTC	TCA	CTC	TGT	AGT	ATT	AGA	AAT	ATA	AGC	CAA	GTT	1345
Asn	Asn	Asn	Lys	Phe	Ser	Leu	Cys	Ser	Ile	Arg	Asn	Ile	Ser	Gln	Val	
			1230					1235				1240				
CTT	GAG	AAG	AAG	AGA	AAC	AAC	TGT	TTT	GTT	GAA	TCT	GGC	CAA	CCT	ATT	1393
Leu	Glu	Lys	Lys	Arg	Asn	Asn	Cys	Phe	Val	Glu	Ser	Gly	Gln	Pro	Ile	
		1245					1250					1255				
TGT	GGA	AAT	GGA	ATG	GTA	GAA	CAA	GGT	GAA	GAA	TGT	GAT	TGT	GGC	TAT	1441
Cys	Gly	Asn	Gly	Met	Val	Glu	Gln	Gly	Glu	Glu	Cys	Asp	Cys	Gly	Tyr	
	1260					1265					1270					
AGT	GAC	CAG	TGT	AAA	GAT	GAA	TGC	TGC	TTC	GAT	GCA	AAT	CAA	CCA	GAG	1489
Ser	Asp	Gln	Cys	Lys	Asp	Glu	Cys	Cys	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln	Pro	Glu	
	1275				1280					1285					1290	
GGA	AGA	AAA	TGC	AAA	CTG	AAA	CCT	GGG	AAA	CAG	TGC	AGT	CCA	AGT	CAA	1537
Gly	Arg	Lys	Cys	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Lys	Gln	Cys	Ser	Pro	Ser	Gln	
				1295				1300						1305		
GGT	CCT	TGT	TGT	ACA	GCA	CAG	TGT	GCA	TTC	AAG	TCA	AAG	TCT	GAG	AAG	1585
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Ala	Gln	Cys	Ala	Phe	Lys	Ser	Lys	Ser	Glu	Lys	
				1310				1315					1320			



TGT CGG GAT GAT TCA GAC TGT GCA AGG GAA GGA ATA TGT AAT GGC TTC	1633
Cys Arg Asp Asp Ser Asp Cys Ala Arg Glu Gly Ile Cys Asn Gly Phe	
1325 1330 1335	
ACA GCT CTC TGC CCA GCA TCT GAC CCT AAA CCA AAC TTC ACA GAC TGT	1681
Thr Ala Leu Cys Pro Ala Ser Asp Pro Lys Pro Asn Phe Thr Asp Cys	
1340 1345 1350	
AAT AGG CAT ACA CAA GTG TGC ATT AAT GGG CAA TGT GCA GGT TCT ATC	1729
Asn Arg His Thr Gln Val Cys Ile Asn Gly Gln Cys Ala Gly Ser Ile	
1355 1360 1365 1370	
TGT GAG AAA TAT GGC TTA GAG GAG TGT ACG TGT GCC AGT TCT GAT GGC	1777
Cys Glu Lys Tyr Gly Leu Glu Glu Cys Thr Cys Ala Ser Ser Asp Gly	
1375 1380 1385	
AAA GAT GAT AAA GAA TTA TGC CAT GTA TGC TGT ATG AAG AAA ATG GAC	1825
Lys Asp Asp Lys Glu Leu Cys His Val Cys Cys Met Lys Lys Met Asp	
1390 1395 1400	
CCA TCA ACT TGT GCC AGT ACA GGG TCT GTG CAG TGG AGT AGG CAC TTC	1873
Pro Ser Thr Cys Ala Ser Thr Gly Ser Val Gln Trp Ser Arg His Phe	
1405 1410 1415	
AGT GGT CGA ACC ATC ACC CTG CAA CCT GGA TCC CCT TGC AAC GAT TTT	1921
Ser Gly Arg Thr Ile Thr Leu Gln Pro Gly Ser Pro Cys Asn Asp Phe	
1420 1425 1430	
AGA GGT TAC TGT GAT GTT TTC ATG CGG TGC AGA TTA GTA GAT GCT GAT	1969
Arg Gly Tyr Cys Asp Val Phe Met Arg Cys Arg Leu Val Asp Ala Asp	
1435 1440 1445 1450	
GGT CCT CTA GCT AGG CTT AAA AAA GCA ATT TTT AGT CCA GAG CTC TAT	2017
Gly Pro Leu Ala Arg Leu Lys Lys Ala Ile Phe Ser Pro Glu Leu Tyr	
1455 1460 1465	
GAA AAC ATT GCT GAA TGG ATT GTG GCT CAT TGG TGG GCA GTA TTA CTT	2065
Glu Asn Ile Ala Glu Trp Ile Val Ala His Trp Trp Ala Val Leu Leu	
1470 1475 1480	
ATG GGA ATT GCT CTG ATC ATG CTA ATG GCT GGA TTT ATT AAG ATA TGC	2113
Met Gly Ile Ala Leu Ile Met Leu Met Ala Gly Phe Ile Lys Ile Cys	
1485 1490 1495	
AGT GTT CAT ACT CCA AGT AGT AAT CCA AAG TTG CCT CCT CCT AAA CCA	2161
Ser Val His Thr Pro Ser Ser Asn Pro Lys Leu Pro Pro Pro Lys Pro	
1500 1505 1510	
CTT CCA GGC ACT TTA AAG AGG AGG AGA CCT CCA CAG CCC ATT CAG CAA	2209
Leu Pro Gly Thr Leu Lys Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Ile Gln Gln	
1515 1520 1525 1530	
CCC CAG CGT CAG CGG CCC CGA GAG AGT TAT CAA ATG GGA CAC ATG AGA	2257
Pro Gln Arg Gln Arg Pro Arg Glu Ser Tyr Gln Met Gly His Met Arg	
1535 1540 1545	



CGC TAA CTGCAGCTTT TGCCTTGGTT CTCCTAGTG CCTACAATGG GAAAACCTCA 2313
 Arg *

CTCCAAAGAG AAACCTATTA AGTCATCATC TCCAAACTAA ACCCTCACAA GTAACAGTTG 2373

AAGAAAAAAT GGCAAGAGAT CATATCCTCA GACCAGGTGG AATTACTTAA ATTTTAAAGC 2433

CTGAAAATTC CAATTTGGGG GTGGGAGGTG GAAAAGGAAC CCAATTTTCT TATGAACAGA 2493

TATTTTAAAC TTAATGGCAC AAAGTCTTAG AATATTATTA TGTGCCCCGT GTTCCCTGTT 2553

CTTCGTTGCT GCATTTTCTT CACTTGCAGG CAAACTTGGC TCTCAATAAA CTTTACCAC 2613

AAAAAAAAAA AA 2625

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 749 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Met Val Leu Leu Arg Val Leu Ile Leu Leu Leu Ser Trp Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Met Gly Gly Gln Tyr Gly Asn Pro Leu Asn Lys Tyr Ile Arg His Tyr
 20 25 30

Glu Gly Leu Ser Tyr Asn Val Asp Ser Leu His Gln Lys His Gln Arg
 35 40 45

Ala Lys Arg Ala Val Ser His Glu Asp Gln Phe Leu Arg Leu Asp Phe
 50 55 60

His Ala His Gly Arg His Phe Asn Leu Arg Met Lys Arg Asp Thr Ser
 65 70 75 80

Leu Phe Ser Asp Glu Phe Lys Val Glu Thr Ser Asn Lys Val Leu Asp
 85 90 95

Tyr Asp Thr Ser His Ile Tyr Thr Gly His Ile Tyr Gly Glu Glu Gly
 100 105 110

Ser Phe Ser His Gly Ser Val Ile Asp Gly Arg Phe Glu Gly Phe Ile
 115 120 125

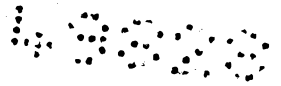
Gln Thr Arg Gly Gly Thr Phe Tyr Val Glu Pro Ala Glu Arg Tyr Ile
 130 135 140



Lys Asp Arg Thr Leu Pro Phe His Ser Val Ile Tyr His Glu Asp Asp
 145 150 155 160
 Ile Asn Tyr Pro His Lys Tyr Gly Pro Gln Gly Gly Cys Ala Asp His
 165 170 175
 Ser Val Phe Glu Arg Met Arg Lys Tyr Gln Met Thr Gly Val Glu Glu
 180 185 190
 Val Thr Gln Ile Pro Gln Glu Glu His Ala Ala Asn Gly Pro Glu Leu
 195 200 205
 Leu Arg Lys Arg Arg Thr Thr Ser Ala Glu Lys Asn Thr Cys Gln Leu
 210 215 220
 Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe Lys Tyr Tyr Gly Thr Arg Glu
 225 230 235 240
 Ala Val Ile Ala Gln Ile Ser Ser His Val Lys Ala Ile Asp Thr Ile
 245 250 255
 Tyr Gln Thr Thr Asp Phe Ser Gly Ile Arg Asn Ile Ser Phe Met Val
 260 265 270
 Lys Arg Ile Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asp Glu Lys Asp Pro Thr Asn
 275 280 285
 Pro Phe Arg Phe Pro Asn Ile Ser Val Glu Lys Phe Leu Glu Leu Asn
 290 295 300
 Ser Glu Gln Asn His Asp Asp Tyr Cys Leu Ala Tyr Val Phe Thr Asp
 305 310 315 320
 Arg Asp Phe Asp Asp Gly Val Leu Gly Leu Ala Trp Val Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ile Cys Glu Lys Ser Lys Leu Tyr Ser Asp
 340 345 350
 Gly Lys Lys Lys Ser Leu Asn Thr Gly Ile Ile Thr Val Gln Asn Tyr
 355 360 365
 Gly Ser His Val Pro Pro Lys Val Ser His Ile Thr Phe Ala His Glu
 370 375 380
 Val Gly His Asn Phe Gly Ser Pro His Asp Ser Gly Thr Glu Cys Thr
 385 390 395 400
 Pro Gly Glu Ser Lys Asn Leu Gly Gln Lys Glu Asn Gly Asn Tyr Ile
 405 410 415
 Met Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Lys Leu Asn Asn Asn Lys Phe
 420 425 430



Ser Leu Cys Ser Ile Arg Asn Ile Ser Gln Val Leu Glu Lys Lys Arg
 435 440 445
 Asn Asn Cys Phe Val Glu Ser Gly Gln Pro Ile Cys Gly Asn Gly Met
 450 455 460
 Val Glu Gln Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Tyr Ser Asp Gln Cys Lys
 465 470 475 480
 Asp Glu Cys Cys Phe Asp Ala Asn Gln Pro Glu Gly Arg Lys Cys Lys
 485 490 495
 Leu Lys Pro Gly Lys Gln Cys Ser Pro Ser Gln Gly Pro Cys Cys Thr
 500 505 510
 Ala Gln Cys Ala Phe Lys Ser Lys Ser Glu Lys Cys Arg Asp Asp Ser
 515 520 525
 Asp Cys Ala Arg Glu Gly Ile Cys Asn Gly Phe Thr Ala Leu Cys Pro
 530 535 540
 Ala Ser Asp Pro Lys Pro Asn Phe Thr Asp Cys Asn Arg His Thr Gln
 545 550 555 560
 Val Cys Ile Asn Gly Gln Cys Ala Gly Ser Ile Cys Glu Lys Tyr Gly
 565 570 575
 Leu Glu Glu Cys Thr Cys Ala Ser Ser Asp Gly Lys Asp Asp Lys Glu
 580 585 590
 Leu Cys His Val Cys Cys Met Lys Lys Met Asp Pro Ser Thr Cys Ala
 595 600 605
 Ser Thr Gly Ser Val Gln Trp Ser Arg His Phe Ser Gly Arg Thr Ile
 610 615 620
 Thr Leu Gln Pro Gly Ser Pro Cys Asn Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Asp
 625 630 635 640
 Val Phe Met Arg Cys Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Pro Leu Ala Arg
 645 650 655
 Leu Lys Lys Ala Ile Phe Ser Pro Glu Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Glu
 660 665 670
 Trp Ile Val Ala His Trp Trp Ala Val Leu Leu Met Gly Ile Ala Leu
 675 680 685
 Ile Met Leu Met Ala Gly Phe Ile Lys Ile Cys Ser Val His Thr Pro
 690 695 700
 Ser Ser Asn Pro Lys Leu Pro Pro Pro Lys Pro Leu Pro Gly Thr Leu
 705 710 715 720
 Lys Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Ile Gln Gln Pro Gln Arg Gln Arg
 725 730 735



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A 9. számú szekvencia szerinti humán dezintegrin vagy egy fragmentumát kódoló DNS fragmentum, amely arthritis kialakulása folyamán különbözőképpen fejeződik ki, és amely dezintegrin antagonizmus szűrésére, továbbá hatóanyag tervezésére és szűrésére alkalmazható.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS által kódolt humán dezintegrin vagy fragmentuma lényegében tiszta formában.

3. Humán dezintegrinhez kötődni képes vegyületek szűrésére alkalmas szűrési eljárás, amely az 1. igénypont szerinti dezintegrin tartalmazza.

4. Humán dezintegrinhez kötődni képes vegyületek szűrésére előállított szűrő készlet, amely az 1. igénypont szerinti dezintegrin tartalmazza.

5. Osteoarthritis szűrésére alkalmas szűrő készlet, amely egy 2. igénypont szerinti humán dezintegrin elleni antitestet vagy ennek fragmentumát tartalmazza.

6. Expressziós vektor vagy plazmid, amely az 1. igénypont szerinti DNS-t tartalmazza.

7. Az 1. igénypont szerinti izolált nukleinsav molekula, amely a 8. számú szekvencia által leírt szekvenciát tartalmazza.

8. Az 1. igénypont szerinti nukleinsav molekula, amely primer extenzió segítségével mutatható ki, vagy 10. számú szekvencia szerinti primer vagy a 11. számú szekvencia szerinti primer alkalmazásával.

9. A 3. igénypont szerinti szűrési eljárás, azzal jelle-



mezve, hogy:

- A) interleukin-1-gyel stimulált kondrocita tenyészetek egy mintáját metalloproteáz gén expresszió inhibitor jelöltek hasításának tesszük ki;
- B) az említett hatásnak kitett mintából RNS-t izolálunk, amely RNS egy metalloproteáz génnek megfelelő mRNSt tartalmaz;
- C) az említett hatásnak kitett mintából izolált említett metalloproteáz génből származó említett mRNA szintet az ilyen hatást nem kapott mintában lévő szinthez hasonlítjuk; és
- D) amennyiben az említett mRNA csökkent szintjei figyelhetők meg, ez inhibitorra utal.

10. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy:

- A) normál humán ízületi kondrociták interleukin-1-gyel stimulált tenyészeiteinek — a tenyésztést inhibitor jelöltek, kontroll inhibitorok jelenlétében és inhibitorok nélkül végezzük — felülűszójából mintát veszünk;
- B) a mintákhoz olyan szubsztrátumot adunk, amely metalloproteáz aktivitás kimutatására alkalmas; és
- C) detektáljuk az egyes minták metalloproteáz aktivitását.

*67 oldal st. almasd
 s.k. D
 2001.02.19.*

A meghatalmazott:

[Handwritten signature]
 Beliczky László
 Szabadalmi ügyvivő
 az S.B.G. & K. Nemzetközi
 Szabadalmi Iroda tagja
 H-1062 Budapest, Ánczánssy út 113.
 Telefon: 34-24-990, Fax: 34-24-323