

## KIVONAT

A2

## Új poli(ADP-ribóz) polimeráz-gének

A találmány tárgyát új, poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) homológok képezik, amelyek aminosav-szekvenciája funkcionális  $\text{NAD}^+$ -kötődoménnel rendelkezik, és nem rendelkezik az alábbi általános képletű PARP „cink-finger” szekvencia-motívummal:  $\text{CX}_2\text{CX}_m\text{HX}_2\text{C}$ , amelyben  $m$  jelentése 28-nál vagy 30-nál nagyobb, egész szám, és  $X$ -gyökök jelentése egymástól függetlenül, bármilyen aminosav. A találmány tárgyát képezik a fehérjéket kódoló gének; az új fehérjékre specifikus antitestek; a találmány szerinti termékeket tartalmazó gyógyszerkészítmények és génterápiás készítmények; a találmány szerinti fehérjék és nukleinsavak analitikai meghatározására szolgáló eljárások; a találmány szerinti fehérjék effektorainak vagy kötőpartnereinek azonosítására szolgáló eljárások; ilyen effektorok aktivitásának meghatározására szolgáló eljárások, valamint mindezek alkalmazása olyan patológias állapotok diagnosztizálására vagy terápiájára, amelyek kifejlődésében és/vagy súlyosbodásában legalább egy PARP-fehérje, vagy ezekből származó polipeptid szerepet játszik, különösen energia-deficit által mediált patológiai állapotok diagnózisára vagy terápiájára.



2001. 08. 22.

## Új poli(ADP-ribóz) polimeráz-gének

A találmány tárgyát új, poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) génjei képezik, valamint ezekből származó fehérjék; az új fehérjékre specifikus antitestek; a találmány szerinti termékeket tartalmazó gyógyszerkészítmények és génterápiás készítmények; a találmány szerinti fehérjék és nukleinsavak analitikai meghatározására szolgáló eljárások; a találmány szerinti fehérjék effektorainak vagy kötőpartnereinek azonosítására szolgáló eljárások; ilyen effektorok aktivitásának meghatározására szolgáló eljárások és ezek alkalmazása patológiás állapotok diagnosztizálására vagy terápiájára.

1996-ban Chambon és munkatársai felfedeztek egy 116 kD méretű enzimet, melyet részletesen azt követő években jellemeztek, és jelenleg PARP-nak (EC 2.4.2.30) [poli(adenozin-5'-difoszfo-ribóz) polimeráz], PARS-nak [poli(adenozin-5'-difoszfo-ribóz) szintetáz] vagy ADPRT-nek (adenozin-5'-difoszfo-ribóz transzferáz) hívják. A növényekben (*Arabidopsis thaliana*) 1995-ben találtak egy 75 kD (637 aminosavból áll) méretű PARP-t [Lepiniec L. et al., FEBS Lett. 364, 103-8 (1995)]. Nem világos, vajon a PARP ezen rövidebb formája egyedi módon növény-specifikus-e vagy műtermék („splicing” variáns vagy hasonló). A 116 kD méretű enzim, jelenlegi ismereteink szerint egyedi módon állatokban és emberben aktív, melyet lentebb leírunk. PARP1-nek jelöljük a félreértések elkerülése végett.

Úgy tűnik, hogy a PARP1 elsődleges fiziológiai funkcióját abban a komplex javító mechanizmusban tölti be, melyet sejtek a



DNS-szálak töréseinek kijavítására fejlesztettek ki. DNS-szálak töréseire adott primer celluláris válaszban továbbá poli(ADP-ribóz) szintetizálódik  $\text{NAD}^+$ -ból, PARP1 által katalizálva [Murcia, G. et al., TIBS 19, 172 (1994)].

PARP1 moduláris struktúrával rendelkezik. Napjainkig három fő funkcionális elemet azonosítottak: N-terminális 46 kD méretű DNS-kötődomént; központi 22 kD méretű automódosító domént, amelyhez poli(ADP-ribóz) képes kapcsolódni, és amelynek PARP1-enzimaktivitása a lánc hosszabbodásával csökken; és C-terminális 54 kD  $\text{NAD}^+$ -kötődomént. Csak a Drosophilából származó PARP esetén leucin-cipzárrégiót találtak az automódosító doménben, ami lehetséges fehérje-fehérje kölcsönhatásokra utal. A jelenleg ismert PARP-ok valószínűleg homodimerként aktívak.

A molekula nagyfokú szerveződése az aminosav-szekvencia erősen konzervatív jellegére utal. Az aminosav-szekvenciában 62%-os konzervatív jelleget találtak emberekből, egerekből, marhából és csirkékből származó PARP1 esetén. Nagyobb strukturális különbségek vannak Drosophilából származó PARP esetén. Maguk az egyedi domének viszont fokozottan konzervatív jellegű klaszterekkel rendelkeznek. Tehát, a DNS-kötő régió két, úgynevezett cink-fin-gert tartalmaz szubdoménként ( $\text{CX}_2\text{CX}_{28/30}\text{HX}_2\text{C}$ -típusú motívumokat tartalmaz), amely az egyszálú DNS-ben lévő szakadások vagy az egyszálú DNS túlnyúlásainak (például kromoszóma-végeknél, a telomerek)  $\text{Zn}^{2+}$ -függő felismerésében játszik szerepet. A C-terminális katalitikus domén körülbelül 50 aminosavból álló (859-908. aminosavak) blokkot tartalmaz, amely körülbelül 100%-ban konzervatív a gerincesekben (PARP-„jelzőszekvencia”). Ez a



blokk köti a  $\text{NAD}^+$  természetes szubsztrátot, és így vezérli a poli-(ADP-ribóz) szintézisét (de Murcia, mint fent). A  $\text{GX}_3\text{GKG}$ -motívum különösen jellemző PARP-okra ebben a blokkban.

A fentebb leírt jótékony funkció ellentétben áll számos betegségben (szélütés, szívinfarktus, szepszis, stb.) fennálló patológiás funkcióval. PARP szerepet játszik az agy [Choi, D. W., *Nature Medicine* 3, 1073 (1997)], a szívizom [Zingarelli, B. et al., *Cardiovascular Research* 36, 205 (1997)] és a szem [Lam, T. T., *Res. Comm. in Molecular Pathology and Pharmacology* 95, 241 (1997)] ischaemiáját eredményező sejtpusztulásban. Gyulladást okozó mediátorok által indukált PARP-aktiválódást megfigyeltek szeptikus sokkban is [Szabo, C. et al., *Journal of Clinical Investigation* 100, 723 (1997)]. Ezekben az esetekben PARP-aktiválódást jelentős mennyiségű  $\text{NAD}^+$ -fogyás kíséri. Mivel négy mol ATP fogy el egy mol  $\text{NAD}^+$  bioszintéziséhez, a celluláris energiaellátás drasztikusan csökken. A következmény sejtpusztulás.

A fentebb, speciális irodalomban említett PARP1-inhibitorok: nikotinamid és 3-amino-benzamid. 3,4-Dihidro-5-[4-(1-piperidinil)-butoxi]-1(2H)-izokinolint Takahashi, K. és munkatársai közölték [*Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 1137 (1997)]. További inhibitorokat leírtak Banasik, M. és munkatársai [*J. Biol. Chem.* 267, 1569 (1992)] és Griffin, R. J. és munkatársai [*Anti-Cancer Drug Design* 10, 507 (1995)].

Humán PARP1 nagy molekulatömegű kötőpartnerei közé tartozik XRCC1-jelű ("X-ray repair cross-complementing 1"), közösleges kivágó javító (BER) fehérje, amely cink-finger motívumon keresztül képes kötődni, és a BRCT-modul (BRCA1 C-terminális, 372-524.



aminosavak) [Masson, M. et al., Molecular and Cellular Biology 18, 3563 (1998)].

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célul tűztük ki új PARP-homológok előállítását, a PARP különféle fiziológiai és patológiai funkciói miatt. Ennek oka, hogy homológ PARP-ok biztosítása különösen fontos lenne új drogcélpontok és új drogok kifejlesztésében, amelyek olyan patológiai állapotok diagnosztizálására és/vagy terápiájára szolgálnak, amelyben PARP, PARP-homológok vagy ezekből származó anyagok játszanak szerepet.

Azt találtuk, hogy ezt a célt olyan, előnyösen emberből és nem-emberi emlősszervezetből származó PARP-homológok előállításával lehet elérni, amelyek aminosav-szekvenciája

a) funkcionális NAD<sup>+</sup>-kötődoménnel, azaz PARP „jelző” („signature”) szekvenciával rendelkezik, amelyre a GX<sub>3</sub>GKG-motívum jellemző;

b) különösen az N-terminális szekvencia-régióban, azaz az első 200 aminosav között, például az első 100, N-terminális aminosav között nem rendelkezik az alábbi általános képletű PARP „cink-finger” szekvencia-motívumokkal:



amelyben

m jelentése 28-nál vagy 30-nál nagyobb egész szám, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav; és funkcionális ekvivalensei.

Mivel a találmány szerinti PARP-molekulákat konkrét funkcionális homológok képviselik, ezek természetesen szintén rendelkeznek poli(ADP-ribóz)-t szintetizáló aktivitással. A NAD-kötődomén lényegében megfelel ennek az aktivitásnak, és a C-termi-



nálisnál lokalizálható.

Tehát a találmány szerinti PARP-ok lényegi tulajdonsága funkcionális NAD<sup>+</sup>-kötődomén (PARP-jelzőszekvencia) jelenléte, amely az aminosav-szekvencia C-terminális régiójában helyezkedik el (azaz körülbelül az utolsó 400 aminosav, például az utolsó 350 vagy 300, C-terminális aminosav által alkotott régióban), kombinációban olyan N-terminális szekvenciával, amely nem tartalmaz cink-finger motívumokat. Mivel az ismert PARP-okban a cink-finger motívumok vélhetően a DNS-törések felismerésében játszanak szerepet, feltételezzük, hogy a találmány szerinti fehérjék nem, vagy más módon lépnek kölcsönhatásba DNS-el. Megfelelő biokémiai tesztekben kimutattuk, hogy a találmány szerinti PARP2 aktiválható „aktivált DNS”-el (azaz DNáz-I alkalmazásával végzett limitált emésztés utáni DNS-el). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a találmány szerinti PARP2 rendelkezik DNS-kötő tulajdonságokkal. Azonban a DNS-kötés mechanizmusa és az enzim aktiválódása különbözik a találmány szerinti PARP-ok és a PARP1 között. A fentebb említettek szerint, DNS-kötését és enzimaktiválását jellegzetes cink-finger motívum mediálja. A találmány szerinti PARP-okban nincsenek ilyen motívumok. Feltételezzük, hogy ezeket a tulajdonságokat a találmány szerinti PARP-ok N-terminális régiójában lévő, pozitívan töltött aminosavak mediálják. Mivel az „aktivált DNS” (azaz DNáz-I alkalmazásával végzett limitált emésztés utáni DNS) nagyszámú defektussal (törések egy szálaban, hiányok egy szálaban, egyszálú túlnyúlások, törések dupla szálaban stb.) rendelkezik, bár PARP1-et és a találmány szerinti PARP-okat ugyanaz az „aktivált DNS” aktiválja,

lehetséges, hogy defektusok különböző szubpopulációja (például hiányok egy számban, ahelyett, hogy törések egy számban) által.

A funkcionális NAD<sup>+</sup>-kötődomén (azaz a katalitikus domén) köti a szubsztrátot poli-(ADP-ribóz)-szintézishez. Az ismert PARP-okban egységesen, elsősorban a GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>GKG-szekvenciamotívum található, amelyben G jelentése glicin, K jelentése lizin és X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> és X<sub>3</sub> jelentése egymástól függetlenül bármilyen aminosav. Azonban, a találmány szerinti PARP-molekulák és a korábban közölt, humán PARP1 NAD<sup>+</sup>-kötődoménjeiben lévő aminosav-szekvenciák összehasonlításával meglepő módon kimutattuk, hogy a találmány szerinti szekvenciák jelentősen különböznek a NAD<sup>+</sup>-kötődomén ismert szekvenciájától.

A találmány szerinti megoldásban előnyben részesített PARP-molekulák csoportja előnyösen az alábbi, általánosan előforduló szekvenciamotívummal rendelkezik katalitikus doménben:

PX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA (11. számú szekvencia, SEQ ID NO: 11),  
különösen

(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFA (12. számú szekvencia, SEQ ID NO: 12), előnyösen

LLWHG(S/T)X<sub>7</sub>IL(S/T)XGLR(I/V)XPX<sub>n</sub>(S/T)GX<sub>3</sub>GKGIYFAX<sub>3</sub>SKSAXY (13. számú szekvencia, SEQ ID NO: 13),

amelyben (S/T) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében S vagy T alternatív módon található, (I/V) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében I vagy V alternatív módon található, és n jelentése 1 és 5 közötti egész szám, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav. Az utolsó motívumot „PARP-jelzőmotívumnak” is hívjuk.



Ehhez hasonlóan, a találmány szerinti PARP-ok előnyösen tartalmaznak az automódosító domént. Ez például a NAD<sup>+</sup>-kötődomén N-terminális vége előtti, körülbelül 100-200 aminosavból álló régióban lokalizálható.

A találmány szerinti PARP-homológok továbbá tartalmazhatnak a NAD<sup>+</sup>-kötődoménhez képest N-terminálisan (azaz körülbelül 30 és körülbelül 80 közötti aminosavra az N-terminálistól) leucin-cipzárzerű szekvenciamotívumot, amelynek általános képlete az alábbi:



(14. számú szekvencia, SEQ ID NO: 14), amelyben (L/V) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében L vagy V alternatív módon található, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav. A találmány szerint megfigyelt leucin-cipzár-motívumok pozícióban határozottan különböznek a Drosophilából származó PARP-ra leírt motívumoktól. A leucin-cipzárak homodimerekhez (két PARP-molekula) vagy heterodimerekhez (egy PARP-molekula eltérő kötőpartnerrel) vezethetnek.

A találmány szerinti PARP-homológok továbbá, előnyösen a fentebb említett leucin-cipzárzerű szekvenciamotívumoktól N-terminálisan, azaz az N-terminálistól körülbelül 10-250 aminosavra az alábbi rész-szekvenciamotívumok közül legalább egyet tartalmaznak:

LX<sub>9</sub>NX<sub>2</sub>YX<sub>2</sub>QLLX(D/E)X<sub>b</sub>WGRVG, (1. motívum; SEQ ID NO: 15);

AX<sub>3</sub>FXX<sub>4</sub>KTXNXWX<sub>5</sub>FX<sub>3</sub>PXK, (2. motívum; SEQ ID NO: 16);

QXL(I/L)X<sub>2</sub>IX<sub>9</sub>MX<sub>10</sub>PLGKX<sub>3</sub>QIX<sub>6</sub>L, (3. motívum; SEQ ID NO: 17);

FYTXIPHXXFGX<sub>3</sub>PP, (4. motívum; SEQ ID NO: 18);

KX<sub>3</sub>LX<sub>2</sub>LXDIEXAX<sub>2</sub>L, (5. motívum; SEQ ID NO: 19),



amelyben (D/E) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében D vagy E alternatív módon található, (I/L) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében I vagy L alternatív módon található, b jelentése 10 vagy 11 egész szám, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav. Legelőnyösebben ezen 1-5. motívumok közül mindegyik jelen van a találmány szerinti szekvenciában úgy, hogy az 1. motívum van legközelebb az N-terminálshoz.

A fentebb említett PARP jelzőmotívumot a találmány szerinti fehérjékben az alábbi motívumok közül legalább egy másik követ:

**GX<sub>3</sub>LXEVALG** (6. motívum; SEQ ID NO: 20)

**GX<sub>2</sub>SX<sub>4</sub>GX<sub>3</sub>PX<sub>a</sub>LXGX<sub>2</sub>V** (7. motívum; SEQ ID NO: 21) és

**E(Y/F)X<sub>2</sub>YX<sub>3</sub>QX<sub>4</sub>YLL** (8. motívum; SEQ ID NO: 22)

amelyben (Y/F) azt jelenti, hogy a szekvencia ezen helyzetében Y vagy F alternatív módon található, a jelentése 7 és 9 közötti egész szám, és X jelentése mindegyik esetben, bármilyen aminosav. Legelőnyösebben ezen három motívum közül mindegyik jelen van a találmány szerinti szekvenciában úgy, hogy a 8. motívum van legközelebb a C-terminálshoz.

A találmány szerint előnyös PARP struktúráját az alábbiak szerint lehet leírni vázlatosan:

1-5. motívumok /PARP-jelzőszekvencia /6-8. motívumok vagy 1-5. motívumok /leucin-cipzár /PARP-jelzőszekvencia /6-8. motívumok lehetővé téve további aminosavakat, például maximum 40-et az egyes egyedi motívumok között elrendezve, és további aminosavakat, például maximum 80-at az N-terminálnál és/vagy a C-terminálnál elrendezve.



A találmány szerint különösen előnyben részesített PARP-homológok az alábbi fehérjék: humán PARP2, humán PARP3, egér eredetű PARP3 és ezek funkcionális ekvivalensei. Humán PARP2-nek jelölt fehérje 570 aminosavat tartalmaz (2. számú szekvencia, SEQ ID NO: 2). Humán PARP3-nak jelölt fehérje valószínűleg két formában lehet. Az 1. típus 533 aminosavat tartalmaz (4. számú szekvencia, SEQ ID NO: 4) és a 2. típus 540 aminosavat tartalmaz (6. számú szekvencia, SEQ ID NO: 6). A formák eltérő transzlációs iniciálás következtében jöhetnek létre. Egér eredetű PARP3-nak jelölt fehérje két formában lehet, amelyek 5 aminosav (15 bp) deléciójában különböznek egymástól. Az 1. típus 533 aminosavat tartalmaz (8. számú szekvencia, SEQ ID NO: 8) és a 2. típus 528 aminosavat tartalmaz (10. számú szekvencia, SEQ ID NO: 10). A találmány szerinti PARP-homológok szekvenciájukban jelentősen különböznek Arabidopsis thalianából származó PARP-fehérjétől (lásd fentebb). Például PARP2 és PARP3 nem tartalmazza a növényi PARP-ra specifikus **AAVLDQWIPD**-peptidszekvenciát, amely megfelel az Arabidopsisból származó fehérje 143-152. aminosavainak.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti PARP-homológok kötőpartnerei. Ezek a kötőpartnerek előnyösen az alábbiak lehetnek:

- a) antitestek és fragmentumaik, például Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>,
- b) fehérjeszerű vegyületek, amelyek például a fenti leucincipzárrégióon vagy más szekvenciárészleten keresztül a PARP-al kölcsönhatást képesek létesíteni, és
- c) kis molekulatömegű effektorok, amelyek képesek PARP-funkciót modulálni, például a PARP katalitikus aktivitását, azaz



NAD<sup>+</sup>-fogyasztó ADP-ribozilálást, vagy aktivátor fehérjéhez vagy DNS-hez való kötődést.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan nukleinsavak, amelyek tartalmazznak:

a) legalább egy, találmány szerinti PARP-homológot kódoló nukleotidszekvenciát, vagy ezzel komplementer nukleotid-szekvenciát;

b) az a)-pontban meghatározott szekvenciához, előnyösen sztringens körülmények között hibridizálódni képes nukleotid-szekvenciát; vagy

c) az a)- és b)-pontban definiált nukleotidszekvenciákból, a genetikai kód degeneráltsága következtében származtatható nukleotid-szekvenciákat.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható nukleinsavak különösen legalább egy olyan részleges szekvenciát tartalmazznak, amely fentebb említett aminosav-szekvenciamotívumokat kódol.

A találmány szerinti megoldásban előnyös nukleinsavak 1. és 3. számú szekvenciával rendelkező nukleotidszekvenciát tartalmazznak, és különösen ezek olyan részleges szekvenciáit, amelyek jellemzőek a találmány szerinti PARP-homológokra, például a nukleotidszekvenciák

a) az 1. számú szekvencia (SEQ ID NO: 1) +3. nukleotidja és +1715. nukleotidja közötti nukleotidokat;

b) a 3. számú szekvencia (SEQ ID NO: 3) +242. nukleotidja és +1843. nukleotidja közötti nukleotidokat;

c) a 5. számú szekvencia (SEQ ID NO: 5) +221. nukleotidja és +1843. nukleotidja közötti nukleotidokat;



d) a 7. számú szekvencia (SEQ ID NO: 7) +112. nukleotidja és +1710. nukleotidja közötti nukleotidokat; vagy

e) a 9. számú szekvencia (SEQ ID NO: 9) +1. nukleotidja és +1584. nukleotidja közötti nukleotidokat

tartalmaznak, vagy az a), b), c), d) és e) pontban leírt részleges szekvenciákat, amelyek a fentebb említett, találmány szerinti PARP-homológokra jellemző aminosav-szekvenciamotívumokat kódolnak.

A találmány tárgyát képezik továbbá expressziós kazetták, amelyek a találmány szerinti, fentebb leírt nukleotidszekvenciák közül legalább egyet tartalmaznak szabályzó nukleotidszekvenciák genetikai kontrollja alatt. Ezeket a találmány szerinti rekombinációs vektorok, például vírusvektorok vagy plazmidok előállítására lehet alkalmazni, amelyek legalább egy, találmány szerinti expressziós kazettát tartalmaznak.

A találmány szerinti rekombinációs mikroorganizmusok a fentebb említett vektorok legalább egyikével vannak transzformálva.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti vektorral transzfektált transzgenikus emlősök.

A találmány tárgyát képezik továbbá PARP-inhibitorokat kimutatni képes, *in vitro* detekciós módszerek, amelyeket homogén vagy heterogén módon lehet végrehajtani, és amelyekben

a) hordozóhoz kötött vagy hordozómentes poli-ADP-ribosilálható célt inkubálunk egy olyan reakciókeverékkel, amely

a1) találmány szerinti PARP-homológot;

a2) PARP-aktivátort; és

a3) PARP-inhibítort vagy olyan analizálandó anyagot



tartalmaz, amelyben feltételezzük, hogy legalább egy PARP-inhibitor van;

b) végrehajtjuk a poli-ADP-ribozilálási reakciót; és

c) kvalitatíve vagy kvantitatíve meghatározzuk a cél poli-ADP-riboziláltságot.

A detektálási eljárást előnyösen úgy hajtjuk végre, hogy a poli-ADP-ribozilálási reakció elvégzése előtt a PARP-homológot előinkubáljuk, például körülbelül 1-30 percig a PARP-aktivátorral és a PARP-inhibitorral vagy olyan analizálandó anyaggal, amelyről feltételezzük, hogy legalább egy PARP-inhibitorral tartalmaz.

Egy szálban törésekkel rendelkező DNS általi aktiválás után (melyet a találmány szerint „aktivált DNS”-nek hívunk), a PARP nagyszámú nukleáris fehérjét poli-ADP-ribozilál NAD jelenlétében. Ilyen fehérjék közé tartozik egyrészt maga a PARP, de hisztonok is, stb.

A detekciós eljárásban poli-ADP-ribozilálható célként előnyösen hiszton-fehérjét alkalmazunk natív formájában vagy abból származó poli-ADP-ribozilálható ekvivalenst. Az alkalmazott hiszton-preparátumot például a Sigma cégtől szereztük be [SIGMA, kat.sz. H-7755; borjú-csecsemőmirigyből származó, II-AS. típusú hiszton; Luck, J. M. et al., J. Biol. Chem. 233, 1407 (1958); Satake, K. et al., J. Biol. Chem. 235, 2801 (1960)]. Elvileg lehetséges minden olyan fehérjetípus vagy azok részeinek alkalmazása, amelyeket a PARP képes poli-ADP-ribozilálni. Ezek előnyösen nukleáris fehérjék, például hisztonok, DNS-polimerázok, telomerázok vagy maga a PARP. A megfelelő fehérjékből származó



szintetikus peptidek is alkalmazhatók célként.

A találmány szerinti ELISA-ban körülbelül 0,1  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  és körülbelül 100  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  közötti, előnyösen körülbelül 1  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  és körülbelül 10  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  közötti mennyiségű hisztont lehet alkalmazni. A PARP-enzim mennyisége körülbelül 0,2 pmol/mérőhely és körülbelül 2 nmol/mérőhely közötti, előnyösen körülbelül 2 pmol/mérőhely és körülbelül 200 pmol/mérőhely közötti tartományban van, a reakciókeverék minden egyes esetben 100  $\mu\text{g}/\text{mérőhelyet}$  tartalmaz. Van lehetőség csökkentésre kisebb mérőhelyek és ennek megfelelően, kisebb reakciótérfogatok irányába.

A találmány szerinti HTRF vizsgálati eljárásban azonos mennyiségű PARP-ot alkalmazunk, és a hiszton vagy módosított hiszton mennyisége körülbelül 2 ng/mérőhely és körülbelül 25  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  közötti, előnyösen körülbelül 25 ng/mérőhely és körülbelül 2,5  $\mu\text{g}/\text{mérőhely}$  közötti tartományban van, a reakciókeverék minden egyes esetben 50  $\mu\text{g}/\text{mérőhelyet}$  tartalmaz. Van lehetőség csökkentésre kisebb mérőhelyek és ennek megfelelően, kisebb reakciótérfogatok irányába.

A találmány szerint alkalmazott PARP-aktivátor előnyösen aktivált DNS.

Különböző típusú károsodott DNS képes aktivátorként működni. A DNS-károsodást előidézhetjük Dnáz-os emésztéssel vagy más DNS-módosító enzimekkel (például restrikciós endonukleázokkal), besugárzással, vagy más fizikai módszerrel, vagy a DNS kémiai kezelésével. Továbbá szimulálni lehet a DNS-károsodás szituációját célirányos módon például úgy, hogy borjú-csecsemőmirigyből szár-



mazó, aktivált DNS-t [Sigma kat.sz. D4522; CAS: 91080-16-9; Aposhian és Kornberg által leírt eljárás szerint, borjú-csecsemőmirigyből származó DNS-ből lett preparálva, Sigma D-1501] és I. típusú dezoxiribonukleázt [D-4263; Aposhian, H. V. és Kornberg, A., J. Biol. Chem. 237, 519 (1962)] alkalmazunk. Az aktivált DNS-t 0,1 és 1000 g/ml közötti, előnyösen 1 és 100 g/ml közötti koncentráció-tartományban alkalmaztuk a reakciólépésben.

A poli-ADP-ribozilálási reakciót a találmány szerinti eljárásban  $\text{NAD}^+$  hozzáadásával indítjuk. A  $\text{NAD}^+$ -koncentrációk körülbelül 0,1  $\mu\text{M}$  és körülbelül 10 mM közötti, előnyösen körülbelül 10  $\mu\text{M}$  és körülbelül 1 mM közötti koncentráció-tartományban voltak.

A fentebb leírt eljárás variánsában, melyet heterogén módon lehet végrehajtani, a hordozóhoz immobilizált cél poli-ADP-ribozilálását anti-poli-(ADP-ribóz)-antitest alkalmazásával határozzuk meg. Ebből a célból a reakciókeveréket elválasztjuk a hordozóhoz immobilizált céltől, mossuk és az antitesttel inkubáljuk. Az antitest maga meg lehet jelölve. Kötött anti-poli-(ADP-ribóz)-antitest detektálására szolgáló alternatív módszerben viszont jelölt szekunder antitestet vagy megfelelő, jelölt antitest-fragmentumot alkalmazhatunk. Alkalmas jelölők például radioaktív jelölés, kromofór- vagy fluorofór jelölés, biotinilálás, kemilumineszcens jelölés, jelölés paramágneses anyaggal, vagy elsősorban jelölés enzimmal, például tormából származó peroxidázzal. Alkalmas jelölési technikák szakember számára általánosan ismertek.

A fentebb leírt eljárás variánsában, melyet homogén módon lehet végrehajtani, a hordozóhoz nem immobilizált cél akceptor



fluorofórral van megjelölve. Ebben az esetben alkalmazott cél előnyösen biotinilált hiszton, az akceptor fluorofór avidinon vagy sztreptavidinon keresztül van kapcsolva a hiszton biotin-jához. Akceptor fluorofórként különösen alkalmasak phycobiliproteinek (például phycocyaninok, phycoerytrinek), például R-phycocyanin (R-PC), allophycocyanin (APC), R-phycoerytrin (P-RE), C-phycocyanin (C-PC), B-phycoerytrin (B-PE) vagy kombinációik egymással vagy más fluoreszcens festékekkel, például Cy5, Cy7 vagy Texas Red (Tandem-system) alkalmazásával [Thammapalerd, N. et al., Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health 27, 297-303 (1996); Kronick, M. N. et al., Clinical Chemistry 29, 1582-1586 (1986); Hicks, J. M., Human Pathology 15, 112-116 (1984)]. A példákban alkalmazott XL665-festék kereszt kötött allophycocyanin [Glazer, A. N., Rev. Microbiol. 36, 173-198 (1982); Kronick, M. N., J. Imm. Meth. 92, 1-13 (1986); MacColl, R. et al., "Phycobiliproteins", CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987); MacColl, R. et al., Arch. Biochem. Biophys. 208, 42-48 (1981)].

Továbbá, a hordozóhoz nem immobilizált cél poli-ADP-ribozilálásának meghatározását szolgáló, homogén eljárásban előnyösen olyan donor fluorofórral megjelölt anti-poli-(ADP-ribóz)-

-antitestet alkalmazunk, amely képes energiát transzferálni az akceptor fluorofórhoz, ha a donor és akceptor térben közel van egymáshoz, a jelölt antitest és a poli-ADP-ribozilált hiszton kötődése miatt. Az anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestet donor fluorofórként előnyösen megjelöljük európium-kriptáttal.



Az alkalmazott európium-kriptáton kívül, más komponenseket is lehet alkalmazni potenciális donor-molekulaként. Másrészt módosítani lehet a kriptát-„kalitkát”. Európium cseréje más ritka-földfémre, például terbiumra, szintén elképzelhető. Döntő fontosságú, hogy a fluoreszcencia hosszú élettartamú legyen, hogy az időbeli késleltetés garantálva legyen [Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-210 (1993); USP 5.534.622. számú szabadalmi irat].

A fentebb leírt detekciós módszerek arra az elvre alapulnak, hogy összefüggés van a PARP-aktivitás és a hisztonokon kialakult ADP-ribóz-polimerek mennyisége között. A leírás szerinti vizsgálati eljárás lehetővé teszi az ADP-ribóz-polimerek mennyiségének meghatározását specifikus antitestek alkalmazásával ELISA-formában, és HTRF („homogenous time-resolved fluorescence”) vizsgálati eljárást. Ezen két vizsgálati eljárás előnyös megvalósítási módjait részletesen ismertetjük az alábbi példákban.

A kifejlesztett HTRF („homogenous time-resolved fluorescence”) vizsgálati eljárásrendszer a hisztonokon kialakult poli-(ADP-ribóz) mennyiségét méri specifikus antitestek alkalmazásával. Az ELSIA-val ellentétben, ezt a vizsgálati eljárást homogén fázisban hajtjuk végre, elválasztási és mosási lépések nélkül. Ez nagyobb mennyiségű mintaszámot és a hibákra kisebb érzékenységet tesz lehetővé. A HTRF fluoreszcencia két fluorofór közötti rezonancia energiatranszfer (FRET) jelenségére épül. FRET vizsgálati eljárásban, egy gerjesztett donor fluorofór képes energiáját átadni egy akceptor fluorofórnak, ha a kettő térben közel van egymáshoz. A HTRF-technológiában a donor-fluorofór európium-



kriptát [(Eu)K], és az akceptor XL665, amely egy stabilizált allophycocianin. Az eurórium-kriptát Jean Marie Lehn (Strasbourg) vizsgálataira épült [Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); USP 5.534.622. számú szabadalmi irat].

Homogén vizsgálati eljárásban valamennyi komponens jelen van a mérés alatt. Míg ez előnyös a vizsgálati eljárás végrehajtása szempontjából (gyorsaság, komplexitás), ki kell zárni a vizsgálati eljárás komponenseitől származó zavaró hatásokat (belső fluoreszcencia, kvencselés festékek által stb.). HTRF kizárja az ilyen zavaró hatásokat két hullámhosszon (665 nm, 620 nm) végzett, időben késleltetett mérés által. A HTRF nagyobb hosszú lecsengési idővel rendelkezik, ezért lehetséges az időben késleltetett mérés. Nem lép fel semmilyen interferencia a rövid élettidejű háttér fluoreszcenciából (például amely a vizsgálati eljárás komponenseiből vagy az anyagkönyvtár inhibitoraiból származik). Továbbá, a mérést mindig két hullámhosszon végezzük abból a célból, hogy kompenzáljuk színes anyagok kvencselő hatásait. HTRF vizsgálati eljárásokat például 96 vagy 384 mérőhelyet tartalmazó mikrotiter-tálcában végezhetünk, és HTRF „discovery” mikrotiter-tálcaanalizáló (Canberra Packard) alkalmazásával értékelhetjük ki.

Szintén a találmány tárgyát képezik az alábbi in vitro szűrési eljárások PARP kötőpartnereinek detektálására, különösen a találmány szerinti PARP-homológokra.

Az első variánst úgy hajtjuk végre, hogy

a1) legalább egy PARP-homológot immobilizálunk hordozóra;

b1) az immobilizált PARP-homológot olyan analizálandó anyag-



gal érintkeztetjük, amelyről feltételezzük, hogy legalább egy kötőpartnert tartalmaz; és

c1) adott esetben megfelelő inkubációs idő után, meghatározzuk az immobilizált PARP-homológhoz kötődött, analizálandó alkotórészeket.

A második variánsban

a2) egy hordozóra olyan analizálandó anyagot immobilizálunk, amely PARP-homológ legalább egy lehetséges kötőpartnerét tartalmazza;

b2) érintkeztetjük az immobilizált analizálandó anyagot legalább egy olyan PARP-homológgal, amelyről feltételezzük, hogy kötőpartner; és

c2) adott esetben megfelelő inkubációs idő után, megvizsgáljuk az immobilizált analizálandó anyagot, hogy kötötte-e a PARP-homológot.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás PARP-homológot kódoló nukleinsav kvalitatív vagy kvantitatív meghatározására, amelyben

a) egy biológiai mintát inkubálunk meghatározott mennyiségű, találmány szerinti exogén nukleinsavval (amely például körülbelül 20-500 bázispár hosszúságú vagy hosszabb), előnyösen sztringens körülmények között hibridizáltatjuk, meghatározzuk a hibridizált nukleinsavakat, és adott esetben összehasonlítjuk egy standarddel; vagy

b) egy biológiai mintát meghatározott mennyiségű, PARP-homológot kódoló nukleinsavra specifikus oligonukleotid primer-párral inkubálunk, amplifikáljuk a nukleinsavat, meghatározzuk

az amplifikációs terméket, és adott esetben összehasonlítjuk egy standarddel.

Szintén a találmány tárgyát képezi eljárás a találmány szerinti PARP-homológ kvalitatív vagy kvantitatív meghatározására, amelyben

a) egy biológiai mintát inkubálunk legalább egy, PARP-homológra specifikus kötőpartnerrel,

b) detektáljuk a kötőpartner/PARP-komplexet, és adott esetben

c) az eredményt összehasonlítjuk egy standarddel.

A kötőpartner ebben az esetben előnyösen anti-PARP-antitest vagy annak kötésre képes fragmentuma, amely adott esetben detektálható jelölőt tartalmaz.

PARP, különösen PARP-homológok, valamint ezeket kódoló nukleinsavszekvenciák meghatározására szolgáló találmány szerinti eljárások alkalmasak és előnyösek szepszissel vagy ischaemiával kapcsolatos szövetpusztulás diagnosztizálására, különösen szélütések, szívinfarktusok, cukorbetegség vagy szeptikus sokk diagnosztizálására.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás PARP-effektorok hatékonyságának meghatározására, amelyben

a) a találmány szerinti PARP-homológot olyan analizálandó anyaggal inkubáljuk, amely PARP-aktivitás fiziológiai vagy patológiai effektorát tartalmazza; adott esetben ismét eltávolítjuk az effektort; és

b) meghatározzuk a PARP-homológ aktivitását, adott esetben szubsztrátok vagy koszubsztrátok hozzáadása után.

A találmány tárgyát képezik továbbá génterápiás készítmények,



amelyek génterápiában elfogadható segédanyagban olyan nukleinsavat tartalmaznak, amely

a) a találmány szerinti kódoló nukleinsavra specifikus, antiszensz nukleinsavat tartalmaz; vagy

b) a találmány szerinti nem-kódoló nukleinsavra specifikus ribozimot tartalmaz; vagy

c) specifikus PARP-inhibitort kódol.

A találmány tárgyát képezik továbbá gyógyászati készítmények, amelyek gyógyászatilag elfogadható segédanyagban legalább egy, találmány szerinti PARP-fehérjét, legalább egy, találmány szerinti PARP-kötőpartnert vagy legalább egy, találmány szerinti kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz.

Végül, a találmány tárgyát képezi PARP-homológ kötőpartnereinek alkalmazása patológiai állapotok diagnózisára vagy terápiájára, amelyek kifejlődésében és/vagy súlyosbodásában legalább egy PARP-fehérje, különösen találmány szerinti PARP-homológ, vagy ezekből származó polipeptid szerepet játszik. Az alkalmazott kötőpartner lehet például alacsony molekulatömegű kötőpartner, amelynek molekulatömege például kevesebb, mint körülbelül 2000 dalton, vagy kevesebb, mint körülbelül 1000 dalton.

A találmány tárgyát képezi továbbá PARP-kötőpartnerek alkalmazása energiadeficit által mediált patológiai állapotok diagnózisára vagy terápiájára. Energiadeficiten a találmány szerint különösen celluláris energiadeficitet értünk, melyet rossz állapotban lévő páciensben megfigyelhetünk szisztémásan vagy egyedi testrégiókban, szervekben vagy szervrégiókban, vagy szövetekben vagy szövetrégiókban. Ezt az állapotot NAD- és/vagy ATP-



kimerülés jellemzi a NAD- és/vagy ATP-szint fiziológiai variációs tartományán kívül (afelett vagy alatta), és előnyösen PARP-aktivitással rendelkező fehérje, különösen a találmány szerinti PARP-homológ vagy azokból származó polipeptid mediálja.

„Energiadeficit által mediált rendellenességek” kifejezésen a találmány szerint továbbá olyan állapotokat értünk, amelyekben szövetkárosodás nekrozis vagy apoptózis eredményeként létrejött sejtpusztulásnak tulajdonítható. A találmány szerinti eljárások alkalmasak apoptózisnak vagy nekrozisnak tulajdonítható sejtpusztulás; ischaemianak és/vagy reperfüzióknak tulajdonítható idegszövet-pusztulás; neurológiai rendellenességek; neurodegeneratív rendellenességek; vaszkuláris szélütés eredményeként kialakult szövetkárosodás kezelésére és prevenciójára; kardiovaszkuláris rendellenességek kezelésére és prevenciójára; más rendellenességek vagy állapotok, például korral járó makuláris degeneráció, AIDS vagy más immunhiányos rendellenességek; artritisz; atheroszklerózis; cachexia; rák; vázizmok degeneratív rendellenességei; cukorbetegség; cranialis trauma; gasztrointesztinális traktus gyulladáshoz kapcsolódó rendellenességei, például Crohn-féle betegség; muszkuláris disztrófia; oszteoartritisz; csontritkulás; krónikus és/vagy akut fájdalom; veseelégtelenség; retinális ischaemia; széptikus sokk (például endotoxin-sokk); a bőr öregedésének és általában az öregedés; az öregedés általános nyilvánulásainak kezelésére. A találmány szerinti eljárások továbbá alkalmazhatók az életkor meghosszabbítására és a testi sejtek proliferatív kapacitásának kiterjesztésére, és tumorsejtek szenzibilizálására besugárzásos terápiával kapcsolatban.



A találmány tárgyát képezi elsősorban PARP-kötőpartner alkalmazása a fentebb definiáltak szerint, energiadeficittal mediált patológiai állapotok diagnózisára vagy (akut vagy profilaktikus) terápiájára, amely állapot például neurodegeneratív rendellenességek, vagy szepszis vagy ischaemia által okozott szövetkárosodás, különösen neurotoxikus zavarok, szélütések, szívinfarktusok, infarktusos lízis alatti vagy utáni károsodás (például TAP-val, Reteplase-al vagy mechanikusan lézerrel vagy Rotablattal) és szívbillentyű-átültetés alatti és utáni mikroinfarktusok, aneurizma kimetszések és szívatültetések, agy- és gerincvelő traumája, veseinfarktus (akut veseelégtelenség, akut veseelégtelenség vagy károsodás veseátültetés alatt és után), vázizom károsodásai, a máj infarktusa (májelégtelenség, károsodás májátültetés alatt vagy után), perifériás neuropátiák, AIDS-demencia, szeptikus sokk, cukorbetegség, ischaemia után elforduló neurodegeneratív rendellenességek, trauma (craniocerebrális trauma), masszív vérzés, subarachnoidális vérzés és szélütés, valamint neurodegeneratív rendellenességek, például Alzheimer-kór, multiinfarktusos demencia, Huntington-kór, Parkinson-kór, amiotrofiikus laterális szklerózis, epilepszia, különösen generalizált (kiterjedt) epilepsziás rohamok, például kisroham (petit mal) és tónusos-klónusos rohamok, valamint parciális epilepsziás rohamok, például halántéklebenyre kiterjedő, és összetett parciális rohamok, veseelégtelenség, tumorok kemoterápiájában, és metasztázis prevenciójában is, valamint gyulladások és reumás rendellenességek, például reumatoid artritisz kezelésének; továbbá kritikusan beszűkült szívkoszorúerek és kritikusan beszűkült pe-



rifériás artériák, például láb-artériák revaszkularizációs kezelésének következtében létrejött szövetkárosodás.

A találmány szerinti megoldásban az „ischaemia” kifejezésen egy szövet oxigénben való gyenge ellátottságát értjük, amelyet artériás véráram blokkoltsága okoz. Globális ischaemia akkor jön létre, ha a véráram az egész agyra kiterjedően megszakad korlátozott ideig. Ezt okozhatja például a szívműködés leállása. Fokális ischaemia akkor jön létre, ha az agy egy részében megszűnik annak normál vérellátása. Fokális ischaemiát véredény tromboembolitikus elzáródása, cerebrális trauma, ödéma vagy agytumor okozhat. Sőt, tranziens ischaemiák széleskörű idegi károsodáshoz vezethetnek. Bár „idegszövet” károsodása bekövetkezhet napokkal vagy hetekkel az ischaemia kialakulása után, bizonyos végleges károsodás (például nekrotikus sejtpusztulás) bekövetkezhet a véráram megszakadása utáni első néhány percben. Ezt a károsodást például glutamát neurotoxicitása okozza, és másodlagos reperfüzió, például szabad gyökök (például oxigént nem tartalmazó gyökök, NO-t nem tartalmazó gyökök) felszabadulása után jön létre. Ischaemiák ehhez hasonlóan kialakulhatnak más szervekben és szövetekben is, például a szívben (szívinfarktus és más kardiovaszkuláris rendellenességek, melyeket szívkoszorúér-elzáródás okoz) vagy a szemben (a retina ischaemiája).

A találmány tárgyát képezi továbbá hatékony terápiás mennyiségű PARP-kötőpartner alkalmazása idegi aktivitás befolyásolására. „Idegi aktivitáson” a találmány szerint károsodott neuronok stimulálást, idegi regenerálódás elősegítését vagy idegi rendellenességek kezelését értjük.

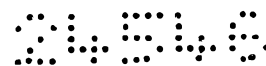


„Idegi károsodás” kifejezésen a leírásban „idegszövet” bármilyen típusú károsodását értjük, és ezen károsodás eredményeként létrejött bármilyen fizikai vagy mentális romlást vagy pusztulást. A károsodás oka természetére nézve lehet például metabolikus, toxikus, kémiai vagy termikus, és például lehetnek ischaemiák, hipoxiák, trauma, cerebrovaszkuláris károsodás, műtétek, nyomás, vérzések, besugárzás, érgörcsök, neurodegeneratív rendellenességek, fertőzések, epilepszia, érzékelési rendellenességek, zavarok a glutamát-metabolizmusban és mindezek által okozott másodlagos hatások.

Az „idegszövet” kifejezésen a leírásban az idegrendszert felépítő különböző komponenseket értjük, amely többek között neuronokból, gliasejtekből, asztrocitákból, Schwann-sejtekből, benne lévő és azt ellátó vaszkuláris rendszerből, központi idegrendszerből, agyból, agytörzsből, gerincvelőből, perifériás idegrendszerből stb. áll.

A „neuroprotektív” kifejezés jelentése a leírásban idegi károsodás csökkentését, megszüntetését, lelassítását vagy javítását, valamint idegi károsodásnak kitett idegszövet védelmét, helyreállítását és regenerálását értjük.

„Neurodegeneratív rendellenességek prevenciója” kifejezésen neurodegeneratív rendellenességek prevenciójának, lelassításának és javításának lehetőségét értjük olyan emberekben, akikben ilyen rendellenességet diagnosztizáltak vagy akik neurodegeneratív rendellenességek tekintetében megfelelő kockázati csoportban vannak. Olyan emberek kezelését is a kifejezésen értjük, akik már szenvednek ilyen rendellenességekből származó szimptó-



mákban.

A leírásban a „kezelés” kifejezésen értjük

(i) rendellenesség, zavar vagy állapot prevencióját ezekre hajlamos emberben;

(ii) rendellenesség, zavar vagy állapot prevencióját úgy, hogy lelassítjuk annak továbbfejlődését;

(iii) rendellenesség, zavar vagy állapot javítását.

„Neurológiai rendellenességek”, amelyeket a találmány szerinti eljárás alkalmazásával lehet kezelni, például neuralgiák (trigeminális, glossopharyngeális), myasthenia gravis, izomdisztrófiák, amiotrofikus laterális szklerózis (ALS), progresszív szív izomsorvadás, mérgezés (például ólommérgezés) okozta perifériás neuropátiák, Guillain-Barré-szindróma, Huntington-kór, Alzheimer-kór, Parkinson-kór vagy plexusrendellenességek. A találmány szerinti eljárások előnyösen neurológiai rendellenességek kezelésére alkalmasak, például fizikai sérülés vagy betegség okozta perifériás neuropátiák; koponyatrauma, például traumatikus agysérülés; a gerincvelő fizikai károsodása; agykárosodással társult szélütés, például hipoxiával és agykárosodással járó vaszkuláris szélütés, és cerebrális reperfüziós károsodás; demielinizációs rendellenességek (mielopátiák, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór, amiotrofikus laterális szklerózis).

A találmány szerinti eljárásokat továbbá kardiovaszkuláris rendellenességek kezelésére lehet alkalmazni. A leírásban „kardiovaszkuláris rendellenességek” kifejezésen olyanokat értünk, amelyek ischaemiákat okoznak szívben, vagy azt a szív ischaemiái



vagy ischaemiája/reperfúziója okozza, például szívkoszorúér-rendellenességek (például atheroszklerózis), angina pectoris, szívinfarktus, szív működés leállása vagy „bypass”-operáció következtében kialakult kardiovaszkuláris károsodás.

A találmány szerinti eljárásokat rák kezelésére vagy ráksejtek besugárzásos terápiára való szenzibilizálására lehet alkalmazni. A „rák” kifejezést a leírásban a legtágabban értjük. A találmány szerinti fehérjék modulátorait „rákellenes terápiás ágensként” lehet alkalmazni. Az eljárásokat például az alábbi ráktípusok vagy tumorsejtek kezelésére lehet alkalmazni: ACTH-termelő tumorok, akut limfatikus vagy limfoblasztikus leukémia; akut vagy krónikus limfocitás leukémia; akut nem-limfocitás leukémia; hólyagrák; agytumorok; mellrák; cervikális karcinóma; krónikus mielocitás leukémia; bélrák; T-sejtes limfóma; endometriózis; nyelvcső-rák; epehólyag-rák; Ewing-féle szarkóma; fej-és nyakrák; nyelv-rák; Hodgkin-limfóma; Kaposi-szarkóma; veserák; májrák; tüdőrák; mesothelioma; mielóma multiplex; neuroblasztóma; non-Hodgkin-limfóma; oszteoszarkóma; petefészek-karcinóma; glioblasztóma; emlő-karcinóma; cervikális karcinóma; prosztataraák; hasnyálmirigy-rák; péniszrák; retinoblasztóma; bőrrák; gyomorrák; pajzsmirigy-rák; méh-karcinóma; vaginális karcinóma; Wilm-féle tumor; vagy trofoblasztóma.

„Radioszenzibilizáló” vagy „besugárzásra szenzibilizáló” a leírásban olyan molekulákat jelent, amely fokozza a testben lévő sejtek érzékenységét elektromágneses sugárzásra (például röntgen-sugarakra) vagy felgyorsítja ezt a sugárkezelést. Besugárzást szenzibilizáló anyagok fokozzák ráksejtek érzékenységét az

elektromágneses sugárzás toxikus hatásai irányában. Ilyeneket közöltek az irodalomban, például mitomicin-C, 5-bróm-dezoxiuridin és metronidazol.  $10^{-20}$  és 10 méter közötti hullámhossztartományba eső sugárzást, előnyösen gamma-sugárzást ( $10^{-20}$  és  $10^{-13}$  m közötti), röntgensugárzást ( $10^{-11}$  és  $10^{-9}$  m közötti), ultraviolet sugárzást (10 nm és 400 nm közötti), látható fényt (400 nm és 700 nm közötti), infravörös sugárzást (700 nm és 1 mm) és mikrohullámú (1 mm és 30 cm közötti) sugárzást lehet alkalmazni.

Ilyen terápiával kezelhető rendellenességek különösen az alábbiak: neopláziás rendellenességek, jóindulatú vagy malignus tumorok és rák. Elektromágneses besugárzás alkalmazásával más rendellenességek kezelése is lehetséges.

A találmány szerinti megoldást most részletesebben a csatolt ábrákra hivatkozva írjuk le. Ezek az alábbiakat mutatják:

Az 1. ábrán egymás alá rendeztük a humán PARP (humán PARP1) és három, találmány szerint előnyös PARP (humán PARP2, humán PARP3, egérezetű PARP3) szekvenciáját. Humán PARP1 és humán PARP2, humán PARP3 vagy egérezetű PARP3 szekvenciáiban az egyezéseket keretezéssel jelöltük. A „többségi” szekvencia (amely az egyes pozíciókban legtöbbször előforduló aminosavakból áll) az egymás alá rendezett szekvenciák fölött látható. Humán PARP1 cink-finger motívumai a 21-56. és 125-162. aminosavaknak megfelelő szekvenciárészekben helyezkednek el.

A 2. ábrán bemutatjuk különböző humán szövetek Northern-blotját a találmány szerinti PARP2- és PARP3-molekulák szöveti megoszlásának szemléltetése céljából. 1. sáv: agy; 2. sáv: szív; 3. sáv: vázizom; 4. sáv: vastagbél; 5. sáv: csecsemőmirigy; 6.



sáv: lép; 7. sáv: vese; 8. sáv: máj; 9. sáv: belek; 10. sáv: méhlepény; 11. sáv: tüdő; 12. sáv: perifériás vér-leukociták; a méret-standardek megfelelő helyzeteket (kb) megjelöltük.

A 3. ábrán bemutatjuk különböző humán szövetek Northern-blotját a találmány szerinti PARP3-molekula szöveti megoszlásának szemléltetése céljából. 1. sáv: szív; 2. sáv: agy; 3. sáv: méhlepény; 4. sáv: tüdő; 5. sáv: máj; 6. sáv: vázizom; 7. sáv: vese; 8. sáv: hasnyálmirigy; a méret-standardek megfelelő helyzeteket (kb) megjelöltük.

A 4. ábrán bemutatjuk különböző humán szövetek Western-blotját a találmány szerinti PARP3-molekula szöveti megoszlásának szemléltetése céljából. 1. sáv: szív; 2. sáv: tüdő; 3. sáv: máj; 4. sáv: lép; 5. sáv: vese; 6. sáv: vastagbél; 7. sáv: izom; 8. sáv: agy; a méret-standardek megfelelő helyzeteket (kb) megjelöltük.

Az 5. ábrán bemutatjuk különböző humán szövetek Western-blotját a találmány szerinti PARP3-molekula szöveti megoszlásának szemléltetése céljából. 1. sáv: elülső agykéreg, 2. sáv: hátsó agykéreg, 3. sáv: kisagy, 4. sáv: hippocampus, 5. sáv: szaglógumó, 6. sáv: harántcsíkolt izom, 7. sáv: thalamus, 8. sáv: középagy, 9. sáv: entorhinalis agykéreg, 10. sáv: pons, 11. sáv: agyvelő, 12. sáv: gerincvelő

A 6. ábra a PARP vizsgálati eljárás vázlatos ábrázolása (ELISA).

A 7. ábra a PARP vizsgálati eljárás vázlatos ábrázolása (HTRF).

A találmány további előnyös megvalósítási módjait az alábbi



részben ismertetjük.

### **PARP-homológok és funkcionális ekvivalensek**

Hacsak másképp nem állítjuk, a találmányi leírásban az aminosav-szekvenciák jelölése az N-terminálisnál kezdődik. Ha egybetűs kódot használunk aminosavak jelölésére, akkor G jelentése glicin, A jelentése alanin, V jelentése valin, L jelentése leucin, I jelentése izoleucin, S jelentése szerin, T jelentése treonin, D jelentése aszparaginsav, N jelentése aszparagin, E jelentése glutaminsav, Q jelentése glutamin, W jelentése triptofán, H jelentése hisztidin, R jelentése arginin, P jelentése prolin, K jelentése lizin, Y jelentése tirozin, F jelentése fenilalanin, C jelentése cisztein és M jelentése metionin.

A találmány szerinti megoldás nem korlátozódik a fentebb konkrétan leírt PARP-homológokra. Ellenkezőleg, a találmány tárgyát képezik azok a homológok is, amelyek ezekkel funkcionális ekvivalensek. Funkcionális ekvivalensek lehetnek a konkrétan leírt fehérjék természetes, például fajspecifikus vagy szervspecifikus, és mesterségesen előállított variánsai. A találmány szerinti funkcionális ekvivalensek humán PARP2-ben (2. számú szekvencia), humán PARP3-ban (4. és 6. számú szekvencia) és egérreredetű PARP3-ban (8. és 10. számú szekvencia) egy vagy több aminosav addíciójával, szubsztitúciójával, inverziójával, inszerciójával és/vagy deléciójával különböznek, amelyek legalább a fehérje NAD-kötő funkcióját megtartották, melyet a C-terminális, funkcionális katalitikus domén mediál. Ehhez hasonlóan, előnyösen a poli-(ADP-ribóz)-t termelő, katalitikus aktivitást is megtartják. Adott esetben, funkcionális variánsok közé tar-



toznak olyan variánsok is, amelyekben a leucin-cipzárhoz hasonló régió lényegében megmaradt.

Továbbá például lehetséges, hogy humán PARP2 vagy humán PARP3 szekvenciájából kiindulva, bizonyos aminosavakat helyettesítünk olyanokkal, amelyek hasonló fizikokémiai tulajdonságokkal (tömeg, bázikus jelleg, hidrofób jelleg, stb.) rendelkeznek. Például lehetséges, hogy arginint helyettesítünk lizinnel, valint helyettesítünk izoleucinnal vagy aszparaginsavat glutaminsavval. Azonban, az is lehetséges egy vagy több aminosav esetén, amely a szekvenciában kicserélendő, hozzáadandó vagy deletálandó, vagy számos ilyen műveletet kombinálható. A humán PARP2- vagy PARP3-szekvenciából kiindulva, így módosított fehérje legalább 60%, előnyösen legalább 75%, nagyon különösen előnyösen legalább 85% homológiával rendelkezik a kiindulási szekvenciával, melyet Pearson és Lipman által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)] algoritmussal számítottunk.

Humán PARP1, 2 és 3 közötti, alábbi homológiákat aminosavszinten és DNS-szinten határoztuk meg (FastA-program, Pearson és Lipman szerint, mint fent):

Aminosav-homológiák:

	Százalékos azonosság	Százalékos azonosság a PARP-jelző-szekvenciában
PARP1/PARP2	41,97% (517)	86% (50)
PARP1/PARP3	33,81% (565)	53,1% (49)
PARP2/PARP3	35,20% (537)	53,1% (49)

A zárójelbe tett számok az átfedő aminosavak számát jelölik.

## DNS-homológiák:

	Százalékos azonosság az ORF-ben	Százalékos azonosság a PARP-jelző-szekvenciában
PARP1/PARP2	60,81% (467)	77,85% (149)
PARP1/PARP3	58,81% (420)	59,02% (61)
PARP2/PARP3	60,22% (269)	86,36% (22)

A zárójelbe tett számok az átfedő nukleotidok számát jelölik.

A találmány szerinti polipeptideket homológ poli-(ADP-ribóz) polimerázként lehet besorolni a katalitikus domén régiójában lévő nagymértékű hasonlóság alapján.

A találmány szerinti megoldásban az is lényegi tulajdonság, hogy az új PARP-homológok nem rendelkeznek hagyományos cink-finger motívumokkal. Ez azt jelenti, hogy ezek az enzimek nem szükségszerűen játszanak szerepet a DNS-hibajavításban, vagy oly módon játszanak szerepet, amely eltér a PARP1-től, de még képesek elvégezni patológiai mechanizmusukat (NAD<sup>+</sup>-fogyasztás és így energiafogyasztás az ATP-fogyasztás következtében). A Western-blotban megfigyelhető erős fehérjeexpresszió (különösen PARP3 esetén) alapján feltételezzük, hogy jelentős szerepet töltenek be a NAD-fogyasztásban. Ez különösen fontos drog kifejlesztésében. A találmány szerinti polimerázok potenciális új inhibitorai tehát képesek a patológiai funkciókat gátolni anélkül, hogy káros hatásokat fejtenének ki a kívánt fiziológiai tulajdonságokra. Ez lehetetlen volt az eddig ismert PARP-inhibitorokkal, mivel mindig gátolva volt a DNS-hibajavító funkció is. Az ismert PARP-inhibitorok potenciális mutagén hatása tehát könnyen érthe-

tő. Elképzelhető olyan PARP-inhibitorok tervezése is, amelyek hatékonyan képesek valamennyi PARP-homológot gátolni nagy affinitással. Ebben az esetben a potenciális hatás bármely kívánt helyzetben alkalmazható.

A találmány szerint előnyös PARP-homológot, melyet 2. számú szekvenciaként bemutatunk (humán PARP2), előnyösen lehet izolálni humán agyból, szívből, vázizomból, veséből és májból. Humán PARP2 expressziója más szövetekben vagy szervekben jól érzékelhetően gyengébb.

A találmány szerint előnyös PARP-homológot, melyet 4. és 6. számú szekvenciaként bemutatunk (humán PARP3), előnyösen lehet izolálni humán agyból (ebben az esetben nagyon előnyösen hippocampusból), szívből, vázizomból, májból vagy veséből. Humán PARP3 expressziója más szövetben vagy szervekben, például izomban vagy májban jól érzékelhetően gyengébb.

Fehérjeizolálásban jártas szakember képes preparatív módszerek olyan kombinációját alkalmazni, amely az egyes esetekben a legalkalmasabb találmány szerinti, természetes PARP-ok szövetekből, vagy rekombinánsan előállított, találmány szerinti PARP-ok sejttenyészetekből való izolálására. Alkalmas standard preparatív módszereket leírt például Cooper, T. G., „Biochemische Arbeitsmethoden“, megjelent Walter de Gruyter, Berlin, New York; vagy Scopes, R. „Protein Purification“, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan PARP1- és PARP3-homológok, amelyek bár más eukarióta fajokból lettek izolálva, azaz gerinctelenekből vagy gerincesekből, különösen más emlős



fajokból, például egerekből, patkányokból, macskákból, kutyákból, sertésekből, juhokból, marhákból, lovakból vagy majmokból, vagy más szervekből, például szívizomból, a találmány szerinti PARP-ok által előre meghatározott, esszenciális strukturális és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek.

Különösen humán agyból izolálható, humán PARP2 és funkcionális ekvivalensei alkalmazhatók előnyösen olyan ágensként, amely neurodegeneratív betegségek, például szélütés inhibitorainak kifejlesztésére szolgál. Ez azért lehetséges, mert feltételezhető, hogy drog kifejlesztése PARP2-re mint indikátorra alapulva lehetővé tesz olyan inhibitorok kifejlesztését, amelyek optimalizálva vannak emberi agyban való alkalmazásra. Azonban nem lehet kizárni, hogy PARP2 alapján kifejlesztett inhibitorok szintén alkalmazhatók más szervekben is PARP-mediált patológiai állapotok kezelésére (lásd a találmány szerinti fehérjék szöveti megoszlását).

PARP2 és feltételezhetően PARP3 is, hasonlóan PARP1-hez, károsodott DNS által aktiválódik, bár feltételezhetően különböző mechanizmus útján. DNS-hibajavításban betöltött jelentősége nyilvánvaló. A találmány szerinti PARP-ok blokkolása szintén jótékony hatással lenne olyan indikációkban, mint a rák (például tumoros páciensek radioszenzibilizálásában).

A találmány szerinti PARP-ok és funkcionális ekvivalenseik másik, esszenciális biológiai tulajdonsága az, hogy képesek kölcsönható partner megkötésére. Humán PARP2 és 3 abban különböznek a korábban leírt, magasabb rendű eukariótákból, például különösen emlősökből származó PARP-októl, hogy potenciálisan úgyneve-



zett leucin-cipzármotívummal rendelkeznek. Ez egy tipikus motívum, amely fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszik szerepet. Lehetséges, hogy ezek a motívumok teszik lehetővé a PARP-aktivitás modulálását kölcsönható partner által. Ez a további strukturális elem tehát szintén biztosít egy lehetséges kiindulási pontot PARP-effektorok, például inhibitorok kifejlesztésére.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan fehérjék, amelyek képesek PARP1 és/vagy 3-al kölcsönhatást létesíteni, különösen olyanok, amelyek aktiválódásukat vagy inaktiválódásukat eredményezik.

A találmány tárgyát képezik továbbá olyan fehérjék, amelyek még rendelkeznek a fentebb említett ligandumkötő aktivitással, és amelyeket konkrét, közölt aminosav-szekvenciákból elő lehet állítani célirányos módosításokkal.

A találmány szerinti fehérjék peptidszekvenciájából kiindulva elő lehet állítani szintetikus peptideket, amelyeket egymagukban vagy kombinációban antigénként lehet alkalmazni poliklonális vagy monoklonális antitestek előállítására. A PARP-fehérjét vagy fragmentumait is lehet alkalmazni antitestek előállítása céljából. A találmány tárgyát képezik tehát a találmány szerinti PARP-fehérjék olyan peptidfragmentumai is, különösen oligo- vagy polipeptidek, amelyek legalább egy, fentebb említett szekvenciamotívumot tartalmaznak. Ilyen típusú fragmentumokat például PARP-fehérjék proteolitikus emésztésével vagy peptidek kémiai szintézisével lehet előállítani.

#### **Új, specifikus PARP2- és PARP3-kötőpartnerek**

A találmány szerinti fehérjékre specifikus, aktív és előnyö-



sen szelektív inhibitorokat fejlesztettünk ki a fentebb PARP2 és PARP3 kötőpartnereire leírt, specifikus vizsgálati rendszerek alkalmazásával. Ezek az inhibitorok adott esetben PARP1-el szemben is aktívak.

A találmány tárgyát képező inhibitorok erős inhibítor-aktivitást képesek kifejteni PARP2-re. A  $K_i$ -értékek ebben az esetben kisebbek, mint körülbelül 1000 nM, például kisebbek, mint körülbelül 700 nM, kisebbek, mint körülbelül 200 nM, vagy kisebbek, mint körülbelül 30 nM, például körülbelül 1 és 20 nM között vannak.

A találmány szerinti inhibitorok meglepő szelektivitást is mutatnak PARP2-re. Ezt a találmány szerinti inhibitorokra számított  $K_i$  (PARP1) :  $K_i$  (PARP2) aránnyal lehet bemutatni, amely például nagyobb, mint 3, vagy nagyobb, mint 5, például nagyobb, mint 10, vagy nagyobb, mint 20.

Példaként meg kell említenünk a 4-(N-[4-hidroxi-fenil]-aminometil)-(2H)-dihidro-ftalazin-1-on-t. A vegyület és más analóg vegyület előállítását Poudzhyunas és munkatársai által [Pharm. Chem. J. 7, 566 (1973)] vagy Mazkanowa és munkatársai [Zh. Obshch. Khim. 28, 2798 (1958)] vagy Mohamed és munkatársai [Ind. J. Chem. B. 33, 769 (1994)] által leírtak szerint végezhetjük, melyeket a kitanítás részének tekintünk.

A fentebb azonosított vegyület 113 nM  $K_i$ -értéket mutat PARP2-re, és nyolcszor szelektívebb PARP2-re, mint PARP3-ra.

#### **PARP-homológokat kódoló nukleinsavak:**

Hacsak másképpen nem jelöljük, a nukleotidszekvenciát a leírásban 5' -től 3' -irányban jelöljük.



A találmány tárgyát képezik továbbá olyan nukleinsav-szekvenciák, amelyek a fentebb említett fehérjéket kódolják, különösen a 2., 4., 6., 8. és 10. számú aminosav-szekvenciával rendelkező fehérjéket, amelyekre nem kívánjuk igényünket korlátozni. A találmány szerint alkalmazható nukleinsavszekvenciák közé tartoznak allélvariánsok is, amelyekhez fentebb, az aminosav-szekvenciákra leírtakhoz hasonlóan, nukleotidok, előnyösen a 1., 3., 7. és 9. számú szekvenciaként bemutatott nukleotidok deléciójával, inverziójával, inszerciójával, addíciójával és/vagy szubsztitúciójával juthatunk úgy, hogy a megfelelő géntermék biológiai tulajdonságai és biológiai aktivitása lényegében megmaradjon. Az alkalmazható nukleotidszekvenciákhoz hozzájuthatunk például olyan nukleotidszubsztitúciókkal, amelyek „csendes” (az aminosav-szekvencia megváltozása nélkül) vagy konzervatív (azonos méretű, töltésű, polaritású vagy oldhatóságú aminosavak cseréje) aminosav-változtatásokat okoznak.

A találmány szerinti nukleinsavszekvenciák közé tartoznak a gének funkcionális ekvivalensei is, úgymint eukarióta homológok, amelyek például gerinctelenekből, például *Caenorhabditis*-ből vagy *Drosophila*-ból származnak, vagy amelyek gerincesekből, például a fentebb leírt emlősökből származnak. Előnyösen alkalmazott gének gerincesekből származnak, amelyek olyan génterméket kódolnak, amelyek lényegében a találmány szerinti géntermékek tulajdonságaival rendelkeznek.

A találmány szerinti nukleinsavakat előállíthatjuk hagyományos módon, különféle módszerekkel:

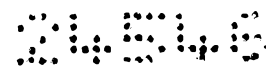
Például genomi vagy cDNS-könyvtárat lehet szűrni olyan DNS-



re, amely PARP-molekulát vagy annak egy részét kódolja. Például humán agyból, szívből vagy veséből előállított cDNS-könyvtárat szűrni lehet alkalmas próbával, például jelölt, egyszálú DNS-fragmentummal, amely megfelel 1. vagy 3. számú szekvenciából kiválasztott, megfelelő hosszúságú, részleges szekvenciának vagy komplementerjének. Ebből a célból például a könyvtár DNS-fragmentumait, alkalmas klónozó vektorba transzferálás után baktériumba lehet transzformálni, azután agar-tálcákra lehet széleszteni. Azután a klónokat át lehet vinni nitocellulóz-szűrőkre, és a DNS denaturálása után hibridizáltatni lehet a jelölt próbával. A pozitív klónokat azután izoláljuk és jellemezzük.

A találmány szerinti PARP-homológokat kódoló DNS-t vagy részleges fragmentumait kémiailag is szintetizálni lehet a bejelentés által tartalmazott szekvenciainformációkból kiindulva. Ebből a célból például körülbelül 100 bázis hosszúságú oligonukleotidokat lehet szintetizálni, és egymás után lehet azokat ligálni olyan, önmagában ismert módon, hogy például alkalmas terminális restriktációs hasítóhelyek jöjjenek létre.

A találmány szerinti nukleotidszekvenciákat polimeráz láncreakció (PCR) segítségével is elő lehet állítani. Ebből a célból cél-DNS-t, például alkalmas, teljes hosszúságú klónból származó DNS-t hibridizáltatunk olyan szintetikus oligonukleotid primerpárral, amely körülbelül 15 bázis hosszúságú, és amely a cél-DNS ellenkező végein kötődik. A közöttük lévő szekvencia-szakaszt DNS-polimerázzal feltöltjük. A ciklus sokszori ismétlése lehetővé teszi a cél-DNS amplifikálását [white et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)].



A találmány szerinti nukleinsavon értünk rövidített szekvenciákat, kódoló vagy nem-kódoló egyszálú DNS-t vagy RNS-t, komplementer DNS-szekvenciát, mRNS-szekvenciákat és ezekből származó cDNS-eket is.

A találmány tárgyát képezik olyan nukleotidszekvenciák, amelyek a fentebb említett szekvenciákkal képesek hibridizálódni sztringens körülmények között. A találmány szerinti megoldásban alkalmazott sztringens hibridizációs körülmények akkor állnak fent, ha a hibridizáló szekvenciák körülbelül 70-100%, például körülbelül 80-100%, vagy 90-100% homológiával rendelkeznek (előnyösen legalább körülbelül 40, például körülbelül 50, 100, 150, 200, 400 vagy 500 aminosavból álló szakaszon).

DNS, különösen cDNS-bankok szűrésére szolgáló sztringens körülményekben például a hibridizációs keveréket 0,1% SDS-t tartalmazó, 0,1 x SSC-bufferrel mossuk (20 X SSC-puffer = 3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát, pH 7,0) , körülbelül 60°C hőmérsékleten.

Northern-blot analíziseket sztringens körülmények között mossuk, például 0,1% SDS-t tartalmazó 0,1 X SSC-vel, körülbelül 65°C hőmérsékleten.

#### **Nukleinsavszármazékok és expressziós konstrukciók**

Nyilvánvaló, hogy a nukleinsavszekvenciákon értünk származékokat is, például promótervariánsokat vagy alternatív splicing útján létrejött variánsokat. A találmány szerinti nukleotid-szekvenciától szintézisiránnyal szemben működőképesen kapcsolt promóterek továbbá módosítva lehetnek addícióv(kk)al vagy szubsztitúcióv(kk)al, inverzióv(kk)al, inszercióv(kk)al és/vagy delécióv(kk)al anélkül, hogy a promóterek funkcióját vagy akti-



vitását hátrányosan befolyásolná. A promóterek aktivitását növelni is lehet szekvenciájuk módosításával, vagy teljesen helyettesíteni lehet egy hatékonyabb promóterekkel, sőt, heterológ szervezetből származó promóterekkel. A fentebb leírt promótervariánsokat a találmány szerinti expressziós kazetták előállítására lehet alkalmazni.

Humán PARP2 splicing variánsaira konkrét példaként szolgálnak az alábbiakban említettek:

Humán PARP2a-variáns: 766-904. bázispárok deléciója (1. számú szekvencia). Ez fáziseltolódáshoz vezet, új stop kódonnal („TAA” megfelel a 922-924. nukleotidoknak az 1. számú szekvenciában).

Humán PARP2b-variáns: a 204. nukleotid (1. számú szekvenciában) után

5' - gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg -3'  
inszerciója. Az inszercióval az alábbi aminosav-szekvencia jön létre: GMPGRSWASKRVS.

Nukleinsav-származékokon olyan variánsokat is értünk, amelyek nukleotidszekvenciái a -1. és -1000. közötti régióban, a startkódon előtt módosítva lettek úgy, hogy a génexpresszió és/vagy fehérjeexpresszió mértéke növekedett.

A fentebb leírt nukleotidszekvenciákon kívül, a találmány szerinti megoldásban alkalmazható nukleinsav-konstrukciók funkcionális, működőképesen kapcsolt, egy vagy több szabályzó szekvenciát tartalmaznak, például promótereket, amplifikációs szignálokat, enhanszereket, poliadenilálási szekvenciákat, replikációs origókat, riportergéneket, szelektálható markergéneket és hasonlókat. Ez a kapcsolat, a kívánt alkalmazástól függően, génexpresszió mér-



tékének növekedéséhez vagy csökkenéséhez vezethet.

Az új szabályzó szekvenciákon kívül még természetes szabályzó szekvenciák is jelen lehetnek az aktuális strukturális gének előtt. Ezt a természetes szabályzást, adott esetben genetikai módosítással le lehet kapcsolni, és a gének expressziójának mértéke növekszik vagy csökken. Azonban a génkonstrukciók rendelkezhetnek egyszerűbb struktúrával, azaz hozzáadott szabályzó szignálok nincsenek inszertálva a strukturális gének elé, és a természetes promóter, szabályzó funkciójával nincs deletálva. Helyette, a természetes szabályzó szekvencia úgy van mutálva, hogy a szabályzás tovább már nem működik, és a génexpresszió fokozódik vagy megszűnik. További előnyös szabályzó elemek inszertálására is van lehetőség a nukleinsavszekvenciák 3'-végéhez. A nukleinsavszekvenciák egy vagy több kópiában lehetnek jelen a génkonstrukcióban.

Előnyösen alkalmazható szabályzó szekvenciák a találmány szerinti expressziós eljárás céljára jelen vannak például az alábbi promóterekben: *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*,  $\lambda$ -PR-promóterekben vagy  $\lambda$ -PL-promóterben, amelyek előnyösen alkalmazhatók Gram-negatív baktériumokban. További előnyös szabályzó szekvenciák vannak például Gram-pozitív *amy-* és *SP02-*promóterekben, az élesztőeredetű *ADC1-*, *MF $\alpha$ -*, *AC-*, *P-60-*, *CYC1-*, *GAPDH-*promóterekben, vagy a növényi eredetű *CaMV/35S-*, *SSU-*, *OCS-*, *lib4-*, *usp-*, *STLS1-*, *B33-*, *nos-*promóterekben vagy az ubiquitin- vagy fazeolin-promóterben.

Elvileg valamennyi természetes promótert lehet alkalmazni



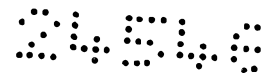
szabályzó szekvenciáikkal. Szintetikus promóterek alkalmazása is lehetséges és előnyös.

A szabályzó szekvenciákat azért alkalmazunk, hogy lehetővé tegyük a nukleinsavszekvenciák specifikus expresszióját és a fehérjeexpressziót. Ez jelentheti például a gazdaszervezettől függően, hogy a gén csak indukció után expresszálódik vagy fokozott mértékben expresszálódik (a termék túltermelődik), vagy azt, hogy azonnal expresszálódik és/vagy fokozott mértékben expresszálódik.

A szabályzó szekvenciák vagy faktorok ezenkívül, előnyösen jótékony hatást képesek kifejteni a bevitt gén expressziójára, és így képesek annak mértékét növelni vagy csökkenteni. Tehát a szabályzó elemek fokozó hatása előnyösen transzkripció szintjén történhet meg, erős transzkripciós szignálok, például az említett promóterek és/vagy enhanszerek alkalmazásával. Azonban lehetőség van a transláció fokozására is, például a mRNS stabilitásának javításával.

Enhanszerek alkalmazása azt jelenti, hogy például lehetővé teszi DNS-szekvenciák fokozott mértékű expresszióját, RNS-polimeráz és DNS között kialakult jobb kölcsönhatás útján.

A rekombináns nukleinsavkonstrukciók vagy génkonstrukciók alkalmas gazdaszervezetben való expresszió céljából, előnyösen gazdaspecifikus vektorba vannak inszertálva, amely lehetővé teszi a gének optimális expresszióját. Vektorok szakember számára jól ismertek, és leírásuk megtalálható például a "Cloning Vectors" című könyvben [szerk. Pouwels, P. H. et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford (1985)]. Plazmidokon kívül vektorokon

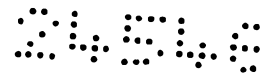


értünk minden más, szakember által ismert vektort, például fágokat, vírusokat, például SV40-et, CMV-t, baculovírust és adenovírust, transzpozonokat, IS-elemeket, plazmidokat, kozmidokat és lineáris vagy cirkuláris DNS-t. Ezek a vektorok autonóm replikáción vagy kromoszómális replikáción képesek átmenni a gazdaszervezetben.

### **A konstrukciók expresszállása:**

A találmány szerinti, fentebb leírt rekombináns konstrukciókat előnyösen bevisszük alkalmas gazda-rendszerbe és expresszálljuk azokat. Előnyösen szakember számára ismert klónozó és expressziós módszereket alkalmazunk a nukleinsavak expresszállására, az adott expressziós rendszerben. Alkalmas rendszereket leírnak például „Current Protocols in Molecular Biology” című könyvben, szerk. F. Ausubel és munkatársai, Wiley Interscience, New York (1997).

Alkalmas gazdaszervezetként szolgálhat elvileg minden olyan organizmus, amely képes a találmány szerinti nukleinsavakat, allélvariánsaikat, funkcionális ekvivalenseiket vagy származékaikat, vagy a rekombináns nukleinsavkonstrukciókat expresszállni. Gazdaszervezeteken értünk például baktériumokat, gombákat, élesztőket, növényi vagy állati sejteket. Előnyösen alkalmazható organizmusok baktériumok, például az *Escherichia* nemzetséghez tartozó baktériumok, például *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* vagy *Pseudomonas*, eukarióta mikroorganizmusok, például *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, állatokból vagy növényekből származó, magasabb rendű eukarióta sejtek, például Sf9- vagy CHO-sejtek.

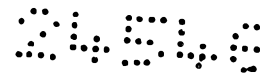


A génterméket szükséges esetben transzgenikus organizmusokban is lehet expresszálni, például transzgenikus állatokban, például főleg egerekben, juhokban vagy transzgenikus növényekben. A transzgenikus organizmusok lehetnek úgynevezett nem-kifejező állatok vagy növények, amelyekben a megfelelő gén ki van kapcsolva, például mutációval vagy részleges vagy teljes delécióval.

A gazdaszervezetek és a szervezeteknek megfelelő vektorok, például plazmidok, vírusok vagy fágok, például az RNS-polimeráz/promóterrendszerrel rendelkező plazmidok,  $\lambda$ -,  $\mu$ -fágok vagy más mérsékelt fágok vagy transzpozonok és/vagy más előnyös szabályzó szekvenciák kombinációja expressziós rendszert alkot. Az „expressziós rendszerek” kifejezés a leírásban előnyösen emlős sejtek, például CHO-sejtek és vektorok, például emlős sejtekben alkalmazható pcDNA3neo-vektor kombinációját jelentik.

A fentebb leírtak szerint, a génterméket előnyösen transzgenikus állatokban is lehet expresszálni, például egerekben, juhban vagy transzgenikus növényekben. Ehhez hasonlóan sejtmentes transzlációs rendszereket lehet programozni a nukleinsavból származó RNS-el.

A génterméket terápiásan vagy diagnosztikailag alkalmas fragmentumok formájában is lehet expresszálni. A rekombináns fehérje izolálása céljából olyan vektorrendszerek vagy oligonukleotidok alkalmazása lehetséges és előnyös, amelyek cDNS-t bizonyos nukleotidszekvenciákkal meghaladják, és így módosított polipeptideket kódolnak, amely a tisztítás egyszerűsítését szolgálja. Ilyen típusú alkalmas módosítások például az úgynevezett toldalékok, amelyek horgonyként működnek, például a hexa-hisztidin-



horgonyként ismert módosítás, vagy olyan epitópokkal való módosítás, amelyeket antitestek antigénként ismernek fel [leírást lásd például Harlow, E. és Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, N. Y. (1988)]. Ezeket a horgonyokat úgy lehet alkalmazni, hogy a fehérjét kifogják szilárd hordozóhoz, például polimer-mátrixhoz, amely például kromatográfiás oszlopba tölthető vagy mikrotiter-tálcához vagy más hordozóhoz kapcsolható.

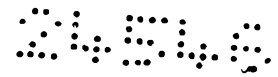
Ezeket a horgonyokat egyidejűleg úgy is lehet alkalmazni, hogy felismerjék a fehérjéket. A fehérjék felismerésére szokásos markereket is lehet alkalmazni, például fluoreszcens festékeket, enzim-markereket, amelyek detektálható reakcióterméket termelnek szubsztráttal való reakció után, vagy radioaktív markereket, egymagukban vagy kombinációban más, fehérjékkel származékot képező horgonyokkal.

#### **Antitestek előállítás:**

Anti-PARP2-antitesteket szakember által ismert módon termelünk. Az antitestek lehetnek poliklonálisak, monoklonálisak, humán vagy humanizált antitestek vagy fragmentumaik, egyláncú antitestek vagy szintetikus antitestek is, hasonlóan antitest-fragmentumok, például Fv, Fab és F(ab')<sub>2</sub>. Alkalmas előállítási módszereket leírtak, például Campbell, A. M. „Monoclonal Antibody Technology”, Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford (1987), és Breitling, F. és Dübel, S., „Rekombinante Antikörper”, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1997).

#### **A kódoló szekvencia további alkalmazása:**

A találmány szerinti cDNS továbbá alapot biztosít az új PARP-

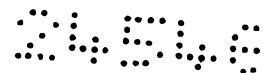


gének genomi szekvenciájának klónozására. Ez tartalmazza az ide vonatkozó szabályzó vagy promóterszekvenciát is, amely például oly módon állhat rendelkezésre, hogy szekvenáljuk a találmány szerinti cDNS-től szintézisiránnyal szemben (5' -irányban) elhelyezkedő vagy a gének intronjaiban elhelyezkedő régiót. A cDNS-szekvenciából kinyerhető információ antiszensz molekulák vagy ribozimok előállításához is alapot jelent, ismert módszerek alkalmazásával [Jones, J. T. és Sallanger, B. A., Nat. Biotechnol. 15, 902 (1997); Nellen, W. és Lichtenstein, C., TIBS 18, 419 (1993)]. A genomi DNS hasonlóan alkalmazható a fentebb leírt génkonstrukciók előállítására.

A nukleotidszekvenciák vagy részeinek alkalmazására másik lehetőség transzgenikus állatok előállítása. A szekvenciainformáció transzgenikus túltermelése vagy genetikai kikapcsolása alkalmas állatmodellben további értékes információkat biztosíthat az új gének (pato)fiziológiájávak kapcsolatban.

#### **Terápiás alkalmazások:**

Olyan helyzetekben, amelyekben a találmány szerinti fehérjéből lényegi hiány van, számos módszert alkalmazhatunk annak helyettesítésére. Egyrészt a fehérjét, természetes vagy rekombináns formában, beadhatjuk közvetlenül vagy génterápiával, a kódoló nukleinsav (DNS vagy RNS) formájában. Erre a célra bármilyen alkalmas vektort lehet alkalmazni, például virális és nem-virális hordozókat egyaránt. Alkalmas módszereket leírt például Strauss és Barranger, „Concepts in Gene Therapy” című könyvben, Walter de Gruyter (1997). Másik alternatívát biztosít endogén gén stimulálása alkalmas ágensekkel.



Blokkolni is lehet a találmány szerinti PARP-ok átviteli sebességét vagy inaktiválását, például proteázokkal. Végül, a találmány szerinti PARP-ok inhibitorait vagy agonistáit is lehet alkalmazni.

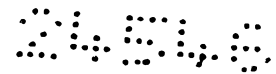
Olyan helyzetekben, amelyekben a PARP feleslegben vagy túlaktivált formában van jelen, különböző típusú inhibitorokat lehet alkalmazni. Ezt a gátlást el lehet érni antiszensz molekulákkal, ribozimokkal, oligonukleotidokkal vagy antitestekkel, és alacsony molekulatömegű vegyületekkel.

A találmány szerinti hatóanyagokat, azaz PARP-fehérjéket, -nukleinsavakat és PARP-kötőpartnereket, például antitesteket vagy modulátorokat beadhatjuk egyetlen terápiás hatóanyagként vagy más terápiás hatóanyagokkal kialakított keverékként. Beadhatjuk azokat úgy, ahogyan rendelkezésre állnak, de általában gyógyszerkészítmények formájában adjuk be azokat, azaz a hatóanyag(ok) és legalább egy, alkalmas gyógyszerészeti hordozó vagy hígítószer keverékeként. A hatóanyagokat vagy készítményeket bármilyen alkalmas módszerrel beadhatjuk, amely az adott terápiás célnak megfelel, például orálisan vagy parenterálisan.

A gyógyszerkészítmény és a gyógyászatilag elfogadható hordozó vagy hígítószer természete a kívánt beadási módtól függ. Orális készítmények például tablettá vagy kapszula formájában lehetnek, és tartalmazhatnak szokásos segédanyagokat, például kötőanyagokat (például szirupot, gumiarábikumot, zselatint, szorbitot, tragantmézgát vagy poli(vinil-pirrolidon)-t, térfogatot növelő anyagokat (például laktózt, cukrot, kukoricakeményítőt, kalcium-foszfátot, szorbitot vagy glicint), síkosító anyagokat (például

magnézium-sztearátot, talkumot, polietilén-glikolt vagy szilika-gélt), mállasztószereket (például keményítőt) vagy nedvesítőszereket (például nátrium-lauril-szulfátot). Orális folyadéktermékek formái lehetnek vizes vagy olajos szuszpenziók, oldatok, emulziók, szirupok, elixírek vagy sprayk stb., vagy lehetnek száraz porok formájában, amelyekből vízzel vagy más, alkalmas hordozóval lehet oldatot készíteni. Az ilyen típusú folyadéktermékek tartalmazhatnak hagyományos adalékanyagokat, például szuszpendáló ágenseket, ízesítő anyagokat, hígítószereket vagy emulgeátorokat. Parenterális beadáshoz oldatokat vagy szuszpenziókat lehet alkalmazni, szokásos gyógyszerészeti hordozókkal. A találmány szerinti hatóanyag parenterális beadása előnyösen olyan folyadék formájú gyógyszerkészítményként történik, amelyet parenterálisan lehet beadni, elsősorban intravénásan. Ez előnyösen legalább egy hatóanyag hatásos mennyiségét tartalmazza, előnyösen oldott formában, gyógyászatilag erre a célra elfogadható hordozóban. Gyógyászatilag erre a célra elfogadható hordozók például főleg vizes oldatok, például fiziológiás sóoldat, foszfáttal pufferolt sóoldat, Ringer-féle oldat, Ringer-féle laktátoldat és hasonlók. A készítmény tartalmazhat továbbá adalékanyagokat, például antioxidánsokat, komplexképző ágenseket vagy antibakteriális ágenseket.

A találmány szerinti hatóanyagok dózisének kiválasztása az egyes esetekben és a konkrét dózisok beadási rendje a kezelő orvos döntésén múlik. Ez utóbbi az alkalmas dózist és a megfelelő dózisadagolási rendet a kiválasztott beadási mód, az egyes esetekre vonatkozóan a gyógyszer hatékonysága, a kezelendő rendelle-



nesség természete és súlyossága, és a páciens állapota és a terápiára adott válasza alapján választja ki. Tehát, például a farmakológiailag aktív anyagokat emlősszervezetnek (embernek vagy állatnak) beadhatjuk körülbelül 0,5 mg és körülbelül 100 mg közötti dózisokban, testtömeg-kg-ra vonatkoztatva, naponta. Beadhatók egyetlen dózisban vagy néhány több dózisban.

#### **Nem-terápiás alkalmazások:**

A találmány szerinti nukleinsavakat, például cDNS-t, a genomi DNS-t, a promótert és a polipeptidet, és ezek részleges fragmentumait rekombináns vagy nem-rekombináns formában alkalmazhatjuk különböző tesztrendszer kifejlesztésére.

Például létrehozható olyan tesztrendszer, amely alkalmas a tesztanyagban jelenlévő promóter vagy fehérje aktivitásának mérésére. A mérési módszerek ebben az esetben előnyösen egyszerűek, például kolorimetriások, luminometriások, fluorimetriások, immunológiaiak vagy radioaktívak, és előnyösen lehetővé tesznek nagy számú tesztminta gyors mérését. Ilyen típusú tesztek alkalmasak és előnyösek úgynevezett nagy hatékonyságú szűrési eljárásra. Ezek a tesztrendszer lehetővé teszik annak meghatározását, hogy tesztanyagok milyen mértékben képesek kötődni agonistájukhoz, antagonistájukhoz vagy milyen mértékben képesek gátolni a találmány szerinti fehérjéket.

A találmány szerinti fehérjék vagy a megfelelő mRNS-ek mennyiségének, aktivitásának és az emberi testben való megoszlásának meghatározását diagnosztikai célokra, bizonyos betegségekre való hajlam meghatározására és azok ellenőrzésére lehet alkalmazni. Ehhez hasonlóan, a cDNS-szekvencia és a genomi szekvencia infor-

mációkat biztosíthat bizonyos betegségek genetikai okairól és azokra való hajlamról. Erre a célra DNS/RNS-próbákat és különféle típusú antitesteket egyaránt lehet alkalmazni. A találmány szerinti nukleotidszekvenciákat vagy azok részeit továbbá alkalmas próbák formájában lehet alkalmazni pontmutációk, deléciók vagy inszerciók detektálására.

A találmány szerinti fehérjéket továbbá természetes ligandumaik vagy kölcsönható partnereik azonosítására és izolálására is lehet alkalmazni. A találmány szerinti fehérjéket továbbá mesterséges vagy szintetikus ligandumaik azonosítására és izolálására lehet alkalmazni. Ebből a célból rekombinánsan termeltetett vagy tisztított, természetes fehérjéből származékot lehet képezni azok módosításával, amely lehetővé teszi hordozó anyagokhoz való kapcsolásukat. Az így kötött fehérjéket különböző analizálandó mintákkal lehet inkubálni, például fehérjeextraktumokkal vagy peptidkönyvtárakkal vagy más ligandumforrásokkal. Specifikusan kötött peptideket, fehérjéket vagy alacsony molekulatömegű, nem fehérjetermészetű anyagokat lehet izolálni és jellemezni ezzel a módszerrel. Nem fehérjetermészetű anyagok például olyan alacsony molekulatömegű kémiai anyagokat jelentenek, amelyek például klasszikus drogszintézisből vagy kombinatorikusan szintetizált, úgynevezett anyagkönyvtárakból származnak.

Az alkalmazott fehérjeextraktumok például növényekből vagy növényi részekből, mikroorganizmusokból, emberi vagy állati szövetekből vagy szervekből származnak.

Ligandumokat és kölcsönható partnereket az élesztő két-hibrid rendszerhez [Fields, S. és Song, O., Nature 340, 245 (1989)] ha-

sonló eljárásokkal is lehet azonosítani. Az alkalmazható expressziós bankok ebben az esetben például humán szövetekből, például agyból, szívből, veséből stb. származhatnak.

A találmány szerinti nukleinsavszekvenciákat és az általuk kódolt fehérjéket reagensek, agonisták és antagonisták vagy inhibitorok kifejlesztésére lehet alkalmazni, amelyek a találmány szerinti fehérjeszekvenciák egyikével társult, krónikus vagy akut betegségek diagnózisára és terápiájára szolgálnak, például azok megnövelt vagy csökkentett mértékű expressziójával. A kifejlesztett reagenseket, agonistákat, antagonistákat vagy inhibitorokat azután gyógyszerkészítmények előállítására lehet alkalmazni, rendellenességek kezelésére vagy diagnózisára. Ebben a vonatkozásban lehetséges betegségek például az agy, a perifériás idegrendszer, a kardiovaszkuláris rendszer vagy a szem betegségei, szeptikus sokk, reumatoid artritisz, cukorbetegség, akut veseelégtelenség vagy rák.

A találmány szerinti fehérjék alkalmazhatóságát az említett indikációkra specifikus inhibitorok alkalmazásával igazoltuk, releváns állatmodellekben.

A találmány szerinti megoldást az alábbi példákra hivatkozva ismertetjük részletesebben.

### **1. példa**

#### **PARP2- és PARP3-cDNS izolálása**

A találmány szerinti cDNS-szekvenciákat először humán agyból (humán agy „5' -Stretch Plus” cDNS-könyvtár, # HL3002a, Clontech) származó cDNS-könyvtár cDNS-klónjainak szekvenciaanalízisével

találtuk meg. Az egérből származó PARP3-klónokat „lambda triplex egéragy cDNS-könyvtárból” izoláltuk (Clontech kat.sz. ML5004t). Ezen klónok szekvenciáit 1., 3., 7. és 9. számú szekvenciaként írjuk le.

## 2. példa

### **PARP2 és PARP3 expressziója humán szövetekben**

Humán PARP2 és humán PARP3 expresszióját tizenkét különböző humán szövetben Northern-blot analízis alkalmazásával vizsgáltuk. Ebből a célból a Clontech cégtől beszerzett, „Human Multiple Tissue Northern Blot”-ot (MTN-t) (#7760-1 és #7780-1) egy RNS-próbával hibridizáltattunk. A próbát megfelelő humán PARP2- és humán PARP3-cDNS-ek in vitro transzkripciójával állítottuk elő, digoxigenin-jelölt nukleotidok jelenlétében, a gyártó (BOEHRINGER MANNHEIM „DIG Easy Hyb”, kat. sz. 1603 558, „DIG Easy Hyb”-módszer RNS:RNS-hibridizációjára) utasításai szerint. Az eljárást úgy módosítottuk, hogy az előhibridizációt 2 x 1 óra hosszáig végeztük, heringspermából származó DNS hozzáadásával (10 mg/ml hibridizációs oldat). Azután a hibridizációt egy éjszakán át végeztük heringspermából származó DNS hozzáadásával (10 mg/ml hibridizációs oldat). A csíkokat „CDP-Star” eljárás (BOEHRINGER MANNHEIM „CDP-Star”, kat.sz. 1685 627) alkalmazásával detektáltuk.

Sztringens mosás után PARP2-transzkriptumokat elsősorban emberi agyban, szívben, vázizomban, vesében és májban detektáltuk. Az 1,9 kb méretű transzkriptum megfelel a cDNS meghatározott hosszúságának (1,85 kb) (2.A ábra).

Más szövetekben vagy szervekben humán PARP2-expresszió mértéke jelentősen kisebb.

Sztringens mosás után PARP3-transzkriptumokat elsősorban szívben, agyban, vesében, vázizomban és májban detektáltuk. Más szövetekben (méhlepény, tüdő, hasnyálmirigy) az expresszió mértéke jelentősen kisebb (2.B ábra). Humán PARP3-nak legalább kétféle transzkriptuma létezik, amely feltételezhetően különböző poliadenilálási helyek vagy alternatív splicing helyek létezésével magyarázható. Méretük (körülbelül 2,2 kb és 2,5 kb, sorrendben) megfelel a cDNS meghatározott hosszúságának (2,3 kb). A mosást 0,2 x SSC/0,2% SDS-t tartalmazó oldattal végeztük szobahőmérsékleten 2 x 15 percig, és azután 0,1 x SSC/0,1% SDS-t tartalmazó oldattal végeztük 65°C-on 2 x 15 percig (20 x SSC elkészítése: 3 M NaCl, 0,3 M nátrium-citrát, pH 7,0).

### **3. példa**

#### **Antitestek előállítása**

A találmány szerinti fehérjékre specifikus antitesteket termeltettünk. Ezeket többek között, PARP2- és PARP3-fehérjemennyiségek szövetekben való megoszlásának analizálására alkalmaztuk immunoblot (Western-blot) analízissel. Ilyen antitestek termeltetését az alábbiakban ismertetjük.

Antitestek termeltetéséhez szintézissel előállítottuk az alábbi peptideket, szakember által ismert módszerekkel. Néhány esetben a ciszteineket a szekvencia N- vagy C-terminálisához kapcsoltuk, KLH-hoz (tengeri tapadókagylóból származó hemocianinhoz) való kapcsolás elősegítése céljából.



- PARP-2: NH<sub>2</sub>-MAARRRRSTGGGRARALNES-CO<sub>2</sub>H (23. számú szekvenciában  
1-20. aminosavak; SEQ ID NO: 23)  
NH<sub>2</sub>-KTELQSPEHPLDQHYRNLHC-CO<sub>2</sub>H (24. számú szekvenciában  
335-353. aminosavak; SEQ ID NO: 24)
- PARP-3: NH<sub>2</sub>-CKGRQAGREEDPFRSTAEALK-CO<sub>2</sub>H (25. számú szekvenciában  
25-44. aminosavak; SEQ ID NO: 25)  
NH<sub>2</sub>-CKQQIARGFEALEALEEALK-CO<sub>2</sub>H (26. számú szekvenciában  
230-248. aminosavak; SEQ ID NO: 26)

Egy reprezentatív példában bemutatjuk anti-PARP3-antitest termeltetését.

Humán PARP3 esetén poliklonális antitesteket nyulakban termeltettünk, NH<sub>2</sub>-KQQIARGFEALEALEEALK-CO<sub>2</sub>H (a humán PARP3 fehérjeszekvenciájában 230-248. aminosavak; 27. számú szekvencia; SEQ ID NO: 27) peptidszekvenciával rendelkező szintetikus peptid alkalmazásával. Az egérből származó, megfelelő szekvencia ebben a régióban csak egy aminosavval különbözik (NH<sub>2</sub>-KQQIARGFEALEALEEAMK-CO<sub>2</sub>H; (28. számú szekvencia; SEQ ID NO: 28). Az N-terminálishoz ciszteint is kapcsoltunk abból a célból, hogy lehetővé tegyük a fehérje KLH-hoz (tengeri tapadókaagylóból származó hemocianinhez) való kapcsolását.

Nyulakat összesen öt alkalommal immunizáltunk, 7-14 naponta, a KLH-peptid-konjugátummal. Az így kapott antiszérumot affinitás-tisztítottuk az antigén alkalmazásával. A specifikus IgG-tartalmú frakciókat a szérumból a megfelelő peptidek alkalmazásával izoláltuk, amelyeket erre a célra először affinitásoszlopra immobilizáltunk szakember által ismert módon. A megfelelő antiszérumot felvittük erre az affinitásoszlopra, és a nem-

specifikusan adszorbeálódott fehérjéket pufferrel eluáltuk. A specifikusan kötődött IgG-frakciót 0,2 M glicin/HCl-pufferrel (pH 2,2) eluáltuk. A pH-t azonnal felemeltük 1 M TRIS/HCl-pufferrel (pH 7,5). Az IgG-frakciót tartalmazó eluátumot 1:1-térfogatarányban összekevertük telített ammónium-szulfát-oldattal, és +4°C-on inkubáltuk 30 percig, a teljes csapadékkiválásig. Az így kapott csapadékot 10.000 g-n centrifugáltuk, és a felülúszó eltávolítása után minimális térfogatú PBS/TBS-ben feloldottuk. Az eredményül kapott oldatot azután PBS/TBS-ben dializáltuk 1:100-térfogatarányban. Az antitestek koncentrációját beállítottuk körülbelül 100 µg IgG/ml-re. Az így tisztított PARP3-antitestek nagymértékben specifikusak voltak PARP3-ra. Míg egérből származó PARP3-at jól felismerték, nem figyeltünk meg keresztreakciót PARP1-el vagy PARP2-vel.

#### **4. példa**

##### **A szövetmegoszlás analízise immunoblottal (Western-blottal)**

PARP2- és PARP3-fehérjemennyiségek szövetekben való megoszlását is vizsgáltuk immunoblot (Western-blot) analízissel.

##### ***Egérből származó szövetek preparálása fehérjegélekhez:***

Szöveteket vagy sejteket Potter vagy Ultra-Turrax alkalmazásával homogenizáltuk. Ebből a célból 0,5 g szövetet (vagy sejteket) inkubáltunk 5 ml pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl<sub>2</sub>), egy tablettá proteáz-inhibitorkeverék (Boehringer Mannheim, kat.sz. 1836153) és benzonáz (I. tisztasági fokozat, MERCK) jelenlétében 37°C-on, 30 percig. Egerekből származó szövetmintákat szívből, tüdőből, májból, lépéből, vesé-

ből, belekből, izomból, agyból és humán embrionális vesesejtekből (HEK293, humán embrionális vese) állítottunk elő.

#### **Fehérjegyélek:**

NOVEX által forgalmazott NuPAGE-rendszert alkalmaztunk fehérjegyélekre leírt utasítások szerint. Poliakrilamid-géleket (NuPAGE 4-12% BisTris, NOVEX NP 0321), futtató puffert (MES futtató puffer, NOVEX NP 0002), antioxidánst (NOVEX NP 0005), fehérje-méretstandardet (Multi Mark Multi Colored Standard, NOVEX LC 5725), mintapuffert (4 X NuPAGE LDS mintapuffer NP 0007) alkalmaztunk. A géleket 45 percig futtattuk 200 V feszültségen.

#### **Western-blot:**

Western-blotokat végeztünk NOVEX-rendszer alkalmazásával, az utasítások szerint. Nitrocellulóz-membránt (Nitrocellulose 45 µm-os pórusméret, NOVEX LC 2001) alkalmaztunk. Az átvitel 1 órát vett igénybe 200 mA áramerősséggel. A transzferpuffer 50 ml, transzferpuffer-koncentrátumból (NOVEX NP 0006), 1 ml antioxidánsból (NOVEX NP 0002), 100 ml analitikai tisztaságú metanolból és 849 ml kétszer desztillált vízből állt.

Az így előállított blotok mellett, előre elkészített blotokat is alkalmaztunk, például amelyek a Chemicon cégtől lehet beszerezni („mouse brain blot”, Chemicon kat.sz. NS 106 az alábbi szövegekkel: 1. elülső agykéreg, 2. hátulsó agykéreg, 3. kisagy, 4. hippocampus, 5. szaglógumó, 6. harántcsíkos izom, 7. thalamus, 8. középagy, 9. entorhinalis agykéreg, 10. pons, 11. agyvelő, 12. gerincvelő).

#### **Antitest-reakció PARP3-al:**

A Western-blotokat 5% tejporral kiegészített TBST-ben (TBS +

0,3% Tween 20) blokkoltuk, legalább 2 óra hosszúra (TBS: 100 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl). Az antitest-reakciót a primer antitesttel (1:1000 hígításban) 5% tejjel kiegészített TBST-ben (lásd fent) végeztük szobahőmérsékleten, legalább 2 óra hosszúra, vagy 4°C-on egy éjszakán át, enyhe kevertetés közben (vertikális rázógép). Ezután háromszor mostuk TBST-ben, 5 percig. A szekunder antitesttel való inkubálást (peroxidázzal kapcsolt anti-nyúl IgG, SIGMA A-6154, 1:2000 hígításban) 5% tejjel kiegészített TBST-ben (lásd fent) végeztük, 1 óra hosszúra. Ezután háromszor mostuk a fentebb leírtak szerint, 5-5 percig alkalmanként. Azt követően kemilumineszcencia felhasználásával detektáltunk, „SUPER BLAZE” reagenskészlet (Pierce, Signal BLAZE Chemiluminescent Substrate 34095) alkalmazásával, a gyártó utasításai szerint. „Lumi-Film”-et (Chemiluminescent Detection Film, Boehringer, kat.sz. 1666916) alkalmaztunk. A filmeket körülbelül 2 perc alatt hívtuk elő („X-ray developer concentrate”, ADEFO-Chemie GmbH), hidratáltuk, körülbelül 4 percig fixáltuk (Acidofix 85 g/l, AGFA), hidratáltuk és azután szárítottuk.

## **5. példa**

### **Az enzimek előállítása**

Összehasonlítás céljából, humán PARP1-et rekombinánsan expresszáltunk baculovírus-rendszerben, szakember által ismert módon, és részlegesen tisztítottuk leírt eljárás szerint [Shah et al., *Analytical Biochemistry* 227, 1-13 (1995)]. Marhából származó PARP1-et 30-50%-os tisztaságban szereztünk be a BIOMOL cégtől (kat.sz. SE-165) (c=0,22 mg/ml, spec. aktivitás 170 nmol

ADP-ribóz/perc/mg összfehérje 25°C-on. Humán és egérreredetű PARP2-t és PARP3-at rekombinánsan expresszáltunk baculovírus-rendszerben („Bac-to-Bac“-rendszer, BRL LifeScience). Ebből a célból a megfelelő cDNS-t pFASTBAC-1-vektorba klónoztuk. Rekombináns baculovírus-DNS-t E.coli-ba való rekombinációval állítottuk elő, azután rovarsejteket (Sf9 vagy High-Five) transzfektáltunk a megfelelő rekombináns baculovírus DNS-ekkel. A megfelelő fehérjék expresszióját Western-blot analízissel igazoltuk. Vírustörzseket amplifikáltunk szakember által ismert módszerrel. Nagyobb mennyiségű rekombináns fehérjéhez úgy jutottunk, hogy 500 ml rovarsejt-tenyészetet ( $2 \times 10^6$  sejt/ml) vírusokkal infektáltunk 5-10 MOI (fertőzési egység; vírusok/sejtek aránya) alkalmazásával, és 3-4 napig inkubáltuk. Azután a rovarsejteket lecentrifugáltuk, és a fehérjéket az üledékből tisztítottuk.

A tisztítást szakember által ismert, klasszikus fehérjetisztítási módszerekkel végeztük, az enzimeket megfelelő, specifikus antitestekkel detektáltuk. Néhány esetben a fehérjéket affinitástisztítottuk 3-amino-benzamid-affinitásoszlopon, leírt módszer szerint [Burtscher et al., Anal. Biochem. 152, 285-290 (1986)]. A tisztaság >90% lett.

## 6. példa

**PARP2- és PARP3-aktivitás, valamint PARP1-re, PARP2-re és PARP-ra ható effektorok inhibitorhatásának meghatározására szolgáló vizsgálati eljárásrendszerek**

### **a) Antitestek termeltetése poli-(ADP-ribóz) ellen**

Poli-(ADP-ribóz)-t antigénként lehet alkalmazni anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestek előállítására céljából. Anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestek előállítását az irodalomban leírták [Kanai, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 300-306 (1974); Kawamitsu, H. et al., Biochemistry 23, 3771-3777 (1984); Kanai, Y. et al., Immunology 34, 501-508 (1978)].

Az alábbi anyagokat alkalmaztuk, többek között: anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestek (nyulakban termeltetett, poliklonális antiszérum), BIOMOL; kat.sz. SA-276, anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestek (monoklonális, egérezeredetű; 10H-klón; hibridóma-felülűszó, affinitástisztított).

Az antiszérumot vagy hibridóma-felülűszóból származó monoklonális antitesteket protein-A-affinitásoszlopon tisztítottuk a szakember által ismert módon.

## **b) ELISA**

### **Anyagok:**

ELISA színreagens: TMB mix, SIGMA T-8540

96 mérőhellyel rendelkező, mikrotiter-tálcát (FALCON Micro-Test III<sup>TM</sup> Flexible Assay Plate, #3912) burkoltunk hisztonokkal (SIGMA, H-7755). A hisztonokat erre a célra karbonát-pufferben (0,05 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>; pH 9,4) feloldottuk 50 µg/ml koncentrációra. A mikrotiter-tálca egyedi mérőhelyeit 150 µl ilyen hiszton-oldattal inkubáltuk szobahőmérsékleten, legalább 2 óra hosszáig, vagy 4°C-on egy éjszakán át. A mérőhelyeket azután 150 µl, karbonát-pufferben oldott, 1%-os BSA-oldattal (SIGMA A-7888) blokkoltuk szobahőmérsékleten, 2 óra hosszáig. Azután három mosási lépés következett mosópufferrel (0,05% Tween10 1 x PBS-ben; PBS, fosz-

fát-pufferolt sóoldat; Gibco kat.sz. 10010: 0,21 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9 g/l NaCl, 0,726 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4). Az összes mosási lépést mikrotiter-tálcamosóban ("Columbus" mikrotiter-tálcamosó, SLT-Labinstruments, Austria) végeztünk.

Az enzimreakcióhoz enzimreakció-oldat és szubsztrát-oldat szükséges, külön-külön előzetesen elkészítve. Ezen oldatok abszolút mennyisége a vizsgálatban felhasználni tervezett mérőhelyek számától függ.

Az enzimreakció-oldat összetétele mérőhelyenként:

- 4  $\mu\text{l}$  PARP-reakciópuffer (1 M Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT)
- 20 ng PARP1 (humán vagy marhaeredetű) vagy 8 ng PARP2 (humán vagy egéredetű)
- 4  $\mu\text{l}$  aktivált DNS (1 mg/ml; SIGMA D-4522)
- 40  $\mu\text{l}$ -ig feltöltve  $\text{H}_2\text{O}$

A szubsztrát-oldat összetétele mérőhelyenként:

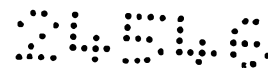
- 5  $\mu\text{l}$  PARP-reakciópuffer (10 x)
- 0,8  $\mu\text{l}$  NAD-oldat (10 mM SIGMA N-1511)
- 44  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

Az inhibitorokat feloldottuk 1 x PARP-reakciópufferben. DMSO (alkalmanként az inhibitorok feloldására használtuk magasabb koncentrációkban) hozzáadása nem okozott problémát 2% végkoncentrációban. Az enzimreakcióban 40  $\mu\text{l}$  enzimreakció-oldatot vittünk be az egyes mérőhelyekre, és 10  $\mu\text{l}$  inhibitor-oldattal inkubáltuk 10 percig. Az enzimreakciót azután mérőhelyenként 50  $\mu\text{l}$  szubsztrát-oldat hozzáadásával indítottuk el. A reakciót szobahőmérsékleten végeztük, 30 percig, és azután úgy állítottuk

le, hogy háromszor mostuk mosópufferrel.

Az alkalmazott primer antitestek specifikus anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestek voltak, 1:5000 hígításban. A hígítást antitest-pufferrel végeztük (1% BSA PBS-ben; 0,05% Tween20). Az inkubációs idő a primer antitestekre egy óra volt szobahőmérsékleten. Azután háromszor mostuk mosópufferrel, majd a szekunder antitesttel (anti-egér IgG, Fab-fragmentumok peroxidázzal jelölve, Boehringer Mannheim kat.sz. 1500.686; anti-nyúl IgG peroxidázzal jelölve, SIGMA kat.sz. A-6154) inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 óra hosszáig, amelynek hígítása 1:10.000 volt antitest-pufferben. Háromszor mostuk mosópufferben, majd elvégeztük a színreakciót, mérőhelyenként 100  $\mu$ l színreagenssel (TMB-mix, SIGMA), szobahőmérsékleten, körülbelül 15 percig. A színreakciót 100  $\mu$ l, 2 M kénsav hozzáadásával állítottuk le. Közvetlenül ezután ELISA-tálcaolvasóban (EAR340AT "Easy Reader", SLT-Labinstruments, Austria) mértünk 450 nm-en, 620 nm-el szemben. A mérési elvet vázlatosan ábrázoltuk a 6. ábrán.

Különböző koncentrációkat alkalmaztunk dózis-hatás-görbe előállítására, egy inhibitor  $K_i$ -értékének meghatározása céljából. Az értékeket három párhuzamossal határoztuk meg egy adott inhibitor-koncentráció esetén. Számtani átlagot Microsoft® Excel alkalmazásával határoztuk meg. Az  $IC_{50}$ -értéket Microcal® Origin Software (5.0 verzió) alkalmazásával határoztuk meg ("Sigmoidal Fit"). Az így kiszámított  $IC_{50}$ -érték átalakítása  $K_i$ -értékre "kalibrációs inhibitorok" alkalmazásával történt. A "kalibrációs inhibitorokat" szintén megmértük az egyes analízisekben. A "kalibrációs inhibitorok"  $K_i$ -értékeit ugyanebben a vizsgálati el-

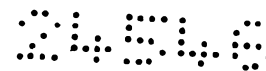


járásrendszerben határoztuk meg a Dixon-görbe analízisével, szakember által ismert módon.

**c) HTRF („homogenous time-resolved fluorescence”) vizsgálati eljárás**

A találmány szerinti HTRF-PARP vizsgálati eljárásban célfehérjeként hisztonokat alkalmazunk PARP-módosításra, melyet közvetve megjelöltünk XL665-fluorofórral. Az anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestet közvetlenül megjelöljük európium-kriptáttal (anti-PAR-kriptát). Ha az XL665-fluorofór térben közvetlen közelben van, amelyet a poli-(ADP-ribóz) hisztonhoz való kötődése biztosít, akkor lehetséges az energiatranszfer. Így a 665 nm-en mért emisszió egyenesen arányos a kötődött antitest mennyiségével, amely viszont ekvivalens a poli-(ADP-ribóz) mennyiségével. Az így mért szignál tehát megfelel a PARP-aktivitásnak. A mérés elvét vázlatosan bemutatjuk a 7. ábrán. Az alkalmazott anyagok ugyanazok voltak, mint az ELISA-ban alkalmazott anyagok (lásd fentebb), hacsak másképpen nem jelöljük.

Hisztonokat feloldottunk 3 mg/ml koncentrációra Hepes-pufferben (50 mM, pH 7,5). A biotinizálást szulfo-NHS-LC-biotinnal végeztük (Pierce, #21335T). Az alkalmazott moláris arány 4 biotin molekula volt egy hisztonra vonatkoztatva. Az inkubációs idő 90 perc volt (RT). A biotinizált hisztonokat azután G25 SF HR10/10-oszlopon (Pharmacia, 17-0591-01) tisztítottuk, Hepes-pufferben (50 mM, pH 7,0), a feleslegben maradt biotinizáló reagens eltávolítása céljából. Az anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestet bifunkciós kapcsoló reagensok [Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39, 196-201 (1993); USP 5.534.622. számú szabadalmi



irat] alkalmazásával jelöltük meg európium-kriptáttal.

A tisztítás G25SF HR 10/30 oszlopon történt. 3,1 kriptát/antitest moláris arányt értünk el. A kitermelés 25% volt. A konjugátumokat  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, 0,1% BSA-t tartalmazó foszfát-puffer (0,1 M, pH 7) jelenlétében.

Az enzimreakcióhoz az alábbi anyagokat pipettáztuk az egyes mérőhelyekre:

- 10  $\mu\text{l}$  PARP-oldat PARP-HTRF-reakciópufferben (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT), 20 ng PARP1-el (humán vagy marhaeredetű) vagy 8 ng PARP2-vel (humán vagy egéredetű)
- 10  $\mu\text{l}$  aktivált DNS PARP-HTRF-reakciópufferben (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
- 10  $\mu\text{l}$  biotinizált hiszton PARP-HTRF-reakciópufferben (1,25  $\mu\text{M}$ )
- 10  $\mu\text{l}$  inhibitor PARP-HTRF-reakciópufferben.

Ezeket a reagenseket 2 percig inkubáltuk, mielőtt a reakciót elindítottuk volna az alábbi oldat hozzáadásával:

- 10  $\mu\text{l}$  NAD-oldat PARP-HTRF-reakciópufferben (41  $\mu\text{M}/\text{ml}$ )

A reakcióidő 30 perc volt szobahőmérsékleten.

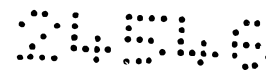
Azután a reakciót az alábbi oldat hozzáadásával állítottuk le:

- 10  $\mu\text{l}$  PARP-inhibitor (25  $\mu\text{M}$ ,  $K_i=10$  nM) „megjelenítő” pufferben (100 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,2 M KF, 0,05% BSA)

Azután hozzáadtuk az alábbi oldatokat:

- 10  $\mu\text{l}$  EDTA-oldat (SIGMA E-7889, 0,5 M, vízben)
- 100  $\mu\text{l}$  Sa-XL665 (Packard Instruments) „megjelenítő” pufferben (15-31,25 nM)
- 50  $\mu\text{l}$  anti-PAR-kriptát „megjelenítő” pufferben (1,6-3,3 nM).

Ezután 30 perc múlva lehet mérni (maximum még 4 óra hosszánig). A mérés „discovery HTRF” mikrotiter-tálcaanalizálóban



(Canberra Packard Instruments) történik. A  $K_i$ -értékeket az ELISA-ra leírtakhoz hasonlóan számítottuk.

### 7. példa

#### **PARP-inhibitorok terápiás hatékonyságának meghatározására szolgáló tesztrendszerek**

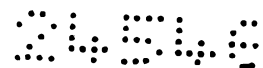
Új PARP-inhibitorok esetleges terápiás hatékonyságát szolgáló releváns farmakológiai modellekben vizsgáltuk. Néhány alkalmas modellre példákat bemutatunk az 1. táblázatban.

1. táblázat

Rendellenesség	Modell	Irodalom
Neurodegeneratív rendellenességek (szélütés, Parkinson-kór stb.)	NMDA excitotoxicitás egerekben vagy patkányokban	Lásd lentebb a leírásban
Szélütés	Permanens MCAO	Tokime, T. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. <u>18</u> , 991-7 (1998); Guegan, C., Brain Research Molecular Brain Research <u>55</u> , 133-40 (1998)
	Tranziens, fokális MCAO patkányokban vagy egerekben	Eliasson MJL et al., Nat. Med. <u>3</u> , 1089-1095 (1997); Endres, M. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. <u>17</u> , 1143-1151 (1997); Takahashi, K. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. <u>17</u> , 1137-1142 (1997)



Parkinson-kór	MPTP-toxicitás egerekben/pat- kányokban	Cosi, C. et al., Brain Res. <u>809</u> , 58-67 (1998) Cosi, C. et al., Brain Res. <u>729</u> , 264-269 (1996)
Szívinfarktus	Szívkoszorúér- elzárás patkányokban, sertésekben vagy nyulakban	Richard,V. et al., Br. J. Pharmacol. <u>113</u> ,869-876 1994) Thiemermann,C. et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>94</u> , 679-83 (1997); Zingarelli, B. et al., Cardiovasc. Res. <u>36</u> , 205-15 (1997)
	Langendorff- szívmodell patkányokban vagy nyulakban	Lásd lentebb a leírásban
Szeptikus sokk	Endotoxin sokk patkányokban	Szabo,C. et al., J. Clin. Invest. <u>100</u> , 723-35 (1997)
	Zymosan- vagy carrageenan- indukált, több szerv elég- telensége patkányokban vagy egerekben	Szabo,C et al., J.Exp.Med. <u>186</u> , 1041-9 (1997); Cuzzocrea,S. et al., Eur.J. Pharmacol. <u>342</u> , 67-76 (1998)
Reumatoid artritisz	Adjuváns- vagy collagén-indu- kált artritisz patkányokban vagy egerekben	Szabo, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>95</u> , 3867-72 (1998)



Cukorbetegség	Streptozotocin- és alloxán- indukált vagy elhízással társult	Uchgata, Y. et al., Diabetes <u>32</u> , 316-8 (1983); Masiello, P. et al., Diabetologia <u>28</u> , 683-686 (1985); Shimabukuro M. et al., J. Clin. Invest. <u>100</u> , 290-295 (1997)
Rák	In vitro modell lásd lentebb	Schlicker et al., <u>75</u> , 91- 100 (1999)

### **a) NMDA excitotoxicitási modell**

A glutamát a legfontosabb ingerközvetítő neurotranszmitter az agyban. Normál körülmények között a glutamát a szinaptikus résbe szekretálódik, és poszt-szinaptikus glutamát-receptorokat stimulál, konkrétan „NMDA” és „AMPA” típusú glutamát-receptorokat. Ez a stimuláció jelentős szerepet játszik az agy számos funkciójában, például a tanulásban, emlékezésben és motoros szabályzásban.

Akut és krónikus neurodegeneráció (például szélütés) körülményei között azonban a preszinaptikus glutamát-szekréciónak mértéke nagymértékben megnövekszik, amely a receptorok túlzott stimulálását eredményezi. Ez a stimulált sejtek pusztulásához vezet. Ezek a fokozott glutamát-aktivitások számos neurológiai rendellenességben vagy fiziológiai zavarban előfordulnak, és túlingeregelt állapotokhoz vagy toxikus hatásokhoz vezetnek a központi idegrendszerben (CNS-ben), de a perifériás idegrendszerben is. Tehát, a glutamát sok neurodegeneratív rendellenességben, különösen hipoxiát, anoxiát, ischaemiát követő neurotoxikus zavarokban, valamint szélütést és traumát követő károsodásokban, és szélütésben, Alzheimer-kórban, Huntington-kórban, amiotrofikus laterális szklerózisban (ALS; Lou Gehring kór), koponyatraumá-

ban, gerincvelői traumában, perifériás neuropátiában, AIDS demenciában és Parkinson-kórban szerepet játszik. Egy másik betegség, amelyben glutamát-receptorok fontos szerepet töltenek be, az epilepszia [Brain Res. Bull. 46, 281-309 (1998); Eur. Neuropsychopharmacol. 8, 141-52 (1998)].

Glutamát-hatások különböző receptorok keresztül mediálódnak. Ezen receptorok közül az egyiket NMDA-receptornak hívják (N-metil-D-aszpartát), egy specifikus antagonistá után [Arzneim. Forschung 40, 511-514 (1990); TIPS 11, 334-338 (1990); Drugs of the Future 14, 1059-1071 (1989)]. N-metil-D-aszpartát glutamát-receptorok egyik konkrét („NMDA”-típusú) osztályának erős antagonistája. Az NMDA-receptor stimulálása kalcium-beáramláshoz és szabad gyökök keletkezéséhez vezet a sejtben. A szabad gyökök jelenléte DNS-pusztuláshoz és PARP-aktiválódáshoz vezet. A PARP viszont sejtpusztulást okoz nagy energiájú foszfátok (NAD és ATP) kimerítése útján a sejtben. Ez magyarázza az NMDA toxicitását. Állatok kezelése NMDA-val ezért úgy tekinthető, mint a fentebb említett rendellenességek modellje, amelyben excitotoxicitás játszik szerepet.

Glutamát-receptorok neurodegenerációban betöltött jelentősége miatt, idáig sok farmakológiai megközelítés irányult pontosan ezen receptorok specifikus blokkolására. Azonban a normál stimulusvezetésben betöltött jelentőségük miatt ezek a megközelítések problematikusnak bizonyultak (mellékhatások). Továbbá, a receptorok stimulálása nagyon gyorsan lejátszódó folyamat, így a receptorok beadása gyakran elkésik („idő-ablak” problémája). Tehát fokozott igény van új hatóelvek kidolgozására és inhibito-

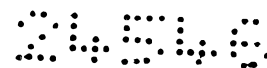
rokra az NMDA-val kapcsolatos neurotoxicitásban.

Ingert létrehozni képes aminosavakkal (NMDA-antagonizmus egérben) előidézett, cerebrális túlingerlés elleni védettség ki-  
elégítő bizonyítéknak tekinthető PARP farmakológiai effektor ak-  
tivitása mellett, excitotoxicitásra alapuló rendellenességekben.  
Ingert létrehozni képes aminosavak (EAA) intracerebrális beadása  
olyan súlyos túlingerlést okoz, amely rövid időn belül rángó-  
görcshöz és az állatok (egerek) pusztulásához vezet.

A jelen esetben intracerebroventrikulárisan, az egyik oldalra  
(unilaterálisan) beadtunk 10  $\mu$ l, 0,035% erősségű, vizes NMDA-  
oldatot, a tesztanyag intraperitoneális (i.p.) beadása után 120  
perccel. Ezeket a szimptomákat gátolni lehet központilag ható  
drogok szisztémás, például intraperitoneális beadásával. Mivel  
EAA-receptorok túlzott mértékű aktiválása a központi idegrend-  
szerben fontos szerepet játszanak különböző neurológiai rendel-  
lenességek patogenezisében, a detektált in vivo EAA-antagoniz-  
musból információkat lehet nyerni az anyagok lehetséges terápiás  
hasznosíthatóságáról ilyen CNS-rendellenességek esetén. Meghatá-  
roztuk azt az ED50-et, amelynél a vizsgálandó anyag korábbi i.p.  
beadása következtében az állatok 50%-a szimptomáktól mentes volt  
fix dózisu NMDA-val, ezt az anyag által kifejtett aktivitás mér-  
tékének tekintettük.

**b) Langendorf-féle modell szívbén (szívinfarktus modellje)**

Hím, sprague-Dawley-patkányokat (300-400 g testtömeg; szármá-  
zás: Janvier, Le Genest-St. Isle, Franciaország) alkalmazunk a  
tesztben. A patkányokat orálisan kezeljük szondán át hatóanyag-  
gal vagy placeboval (térfogata 5 ml/kg). 50 perccel később



intraperitoneálisan beadunk heparint (Liquemin N Roche, 125 IU/állat 0,5 ml-ben). Az állatokat anesztéziának vetjük alá Inactin® T133 (10%-os nátrium-tiobétabarbitál) alkalmazásával, műtéti asztalra rögzítjük azokat, tracheotomiát (légcsőmetszést) végzünk és „Harvard” lélegeztető pumpával lélegeztetjük (40/perc ritmusban, 4,5 ml/ütemenként). A mellkas megnyitása (thoracotomia) után azonnal katétereztük az aortát, eltávolítottuk a szívet, és azonnal retrográd perfúziót végeztünk. A szíveket állandó, 75 mmHg nyomás alatt perfúciónak vetettük alá, melyet „Gilson Miniplus 2” perfúziós pumpával végzünk. A perfúziós folyadék összetétele az alábbi (nmol/l-ben): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,52, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glükóz 11. A hőmérsékletet 37°C-on tartjuk a kísérlet alatt. A funkcionális paramétereket folyamatosan rögzítettük, „Gould” 4 csatornás rekorder alkalmazásával. Megmértük a bal ventrikuláris nyomást (LVP, mmHg), LVEDP-t (mmHg), enzimfelszabadulást (kreatin kináz, mU/ml/g), áramlási sebességet a koszorúérben (ml/perc), HR-t (pulzussebesség, min<sup>-1</sup>). A bal ventrikuláris nyomást folyadékkal töltött, látex-ballon és „Statham23 Db” nyomásátalakító alkalmazásával mértük. A ballon térfogatát az elején úgy állítjuk be, hogy 12 mmHg LVEDP-t (bal ventrikuláris nyomás a diastole végén) érjen el. A  $dp/dt_{max}$  (maximális pumpaerő) a nyomás-jelből, differenciáló modul alkalmazásával származtatható. A pulzust a nyomás-jelből számítottuk. Az áramlási sebességet cseppszámláló (BMT Messtechnik GmbH Berlin) alkalmazásával határoztuk meg. 20 perc ekvilibrációs idő után a szíveket 30 perces, globális ischaemiának vetettük alá úgy, hogy leállított-

tuk a perfúziós ellátást, míg a hőmérsékletet 37°C-on tartottuk. Ezután 60 perces reperfúzió periódus következett, amelyben 3, 5, 10, 15, 30, 45 és 60 perc múlva mintákat vettünk kreatin kináz (CK) aktivitásának meghatározása céljából. A mért paraméterek átlagait és standard deviációkat statisztikusan (Dunnett-teszt) analizáltuk. A szignifikancia limit  $p=0,05$  volt.

Nyúlshíveken végzett kísérleteket hasonlóan hajtottunk végre. Hím, fehér, New Zealand nyulakat (Interfauna cégtől szereztük be) alkalmaztunk. A szíveket a fentebb, patkánymodell esetén leírtakhoz hasonlóan preparáltunk. A perfúziós nyomást 60 mmHg maximumra és az áramlási sebességet körülbelül 25 ml/perc-re állítottuk. Az ekvibrációs idő körülbelül 30 perc volt. Az anyagot infúzióval adtuk be, közvetlenül a szív fölé. Az infúzió kezdete után 15 perccel előidéztünk 30 perces globális ischaemiát úgy, hogy leállítottuk az áramlást, míg a szív hőmérsékletét fenntartottuk. Ezután 30 perces reperfúzió következett. A perfúziós folyadékból mintákat vettünk CK-aktivitás meghatározása céljából, az anyag beadása előtt, azután 15 perccel és különböző időpontokban (5, 10, 15, 20, 30 perccel) a reperfúzió alatt. Az alábbi paramétereket mértük: LVP (mmHg), LVEDP, LVdP/dt, PP (mmHg), HR (pulzusszám; szívverés/perc), CK-aktivitás (U/perc/g szívtömeg).

### **c) Állatmodell akut veseelégtelenségre**

PARP-inhibitorok intravénás beadásának (4 nap) védő hatását vizsgáltuk patkányvesék működésére, posztischaemiás, akut veseelégtelenségben.

Hím, Sprague-Dawley-patkányokat (körülbelül 330 g testtömeg a kísérlet elején; tenyésztő: Charles River) alkalmaztunk. 10-15

állatot alkalmaztunk kísérleti csoportonként. A hatóanyagot/placebot folyamatosan adagoltuk a combcsonti érbe, ozmotikus mikropumpával. Szemüregből (orbitális) vérmintákat vettünk enflurán (Ethrane Abbot, Wiesbaden) alkalmazásával végzett inhalációs anesztézia alatt.

A kezdeti mérések (vérmintákon) és 24 óra alatt kiválasztott vizelet mennyiségének meghatározása után, a patkányokat anesztéziának vetettük alá („Nembutal”, nátrium-pentobarbitál, Sanofi CEVA; 50 mg/kg i.p., 1,0 ml térfogatot injektáltunk kg-ként), és melegíthető (37°C) operációs asztalra rögzítettük azokat. Beadtunk i.v. 125 IU/kg heparint (Liquemin N, Roche) a farkhoz tartozó érbe. A hasüreget felnyitottuk, és a jobb vesét hozzáférhetővé tettük. A leágazó veseartériát ehhez hasonlóan hozzáférhetővé tettük, és szorítókapoccsal elzártuk (fent, körülbelül félúton a vese irányában). Az operáció idejére egy ozmotikus mikropumpát implantáltunk a combcsonti érbe. A beleket visszahehelyeztük, és a folyadékvesztéséget langyos, 0,9%-os NaCl-el pótoltuk. Az állatokat letakartuk nedves ruhával, és vörös lámpa alatt, melegen tartottuk. 40 perc múlva a vesék külső megjelenését feljegyeztük, és a szorítókapcsokat eltávolítottuk, először a jobbát, azután a balt. A beleket kivettük, és hozzáadtunk 2 csepp antibiotikumot (Tardomyocel, Bayer). A hasfalat steril macskabéllel (Ethicon No.4) lezártuk, és még egyszer kezeltük 1 csepp antibiotikummal. Az epidermiszt elvarrtuk steril Ethibond Exel (Ethicon No. 3/0) alkalmazásával, és a varratot lesprayztuk Nebacetin N (Yamanouchi) sebspray-vel. A tizedik napi drog/placebo-dózist i.v. bóluszként adjuk be.

A kísérlet 1., 2. és 4. napján mintákat és vért vettünk a szérum és a vizelet alábbi biokémiai paramétereinek vizsgálatára: Na, K, kreatinin, fehérje (csak a vizeletben). Továbbá feljegyeztük a táplálék- és vízfogyasztást, testtömeget és a vizelet térfogatát. A 14. nap után az állatokat elpusztítottuk, és a veséket vizsgáltuk.

A kiértékelésben kizártunk minden olyan állatot, amely infarktusból elpusztult a kísérlet alatt, vagy nekroszkópiában infarktust mutatott a 14. napon. A kreatinin-ürítést és a frakcionális nátrium-kiválasztást számítottuk vesefunkcióra vonatkozó paraméterként, összehasonlítva a kezelt állatokat a kontrollal és az álkezelt állatokkal.

***d) In vitro modell radioszenzibilizálásra (tumor terápiája)***

MCF-7-sejteket (humán mellkarcinóma) tenyésztettünk Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközegben, amely 10% hőinaktivált FCS-t és 2 mM L-glutamint tartalmazott. A sejteket egy éjszakára szélesztettük 100, 1000 vagy 10.000 sejt/tenyésztőhely sűrűségben, 6 mérőhelyet tartalmazó tálcára, és azután ionizáló sugárzásnak vetettük alá 0 és 10 Gy közötti tartományban ( $^{137}\text{Cs}$ , Shepard Mark, model I-68A, dózissebesség 3,28 Gy/perc). A besugárzás után 10 nappal a kísérletet számlálással kiértékeltek, amelyben ötven sejtet tartalmazó kolóniákat tekintettünk pozitívnak.

***e) Szélütés modellje (fokális cerebrális ischaemia; MCA, azaz középső cerebrális artéria elzáródásának modellje patkányban)***

Létrehoztunk fokális ischaemiát a jobb disztális MCA kauterizációjával, Sprague-Dawley vagy Long-Evans patkányokban. A patkányokat a találmány szerinti fehérjék modulátoraival ke-

zelhetjük az MCA-elzáródás megkezdése előtt vagy után. 1-10 mg/kg dózist választunk (bólush alkalmazásban), adott esetben 0,5-5 mg/kg/óra folyamatos infúzióval.

A patkányokat anesztéziának vetettük alá halotán 70% nitrogénben és 30% oxigénben való (4% a kezdeti fázisban és 0,8-1,2% az operáció alatt) alkalmazásával. A testhőmérsékletet állandóan mértük rektálisan, és állandóan tartottuk  $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ -on, szabályozható, melegítő takaróval. Továbbá, adott esetben mértük az artériás vérnyomást, artériás pH-t,  $\text{Pa}(\text{O}_2)$ -t és  $\text{Pa}(\text{CO}_2)$ -t a farokhoz tartozó érbe helyezett katéterrel. Ezután létrehoztuk a fokális ischaemiát, Chen és munkatársai [Stroke 17, 738-743 (1986)] vagy Liu és munkatársai [Am. J. Physiol. 256, H589-593 (1989)] által leírt módszer szerint úgy, hogy a jobb MCA disztális részét folyamatosan kauterizáltuk. Ha az operációt befejeztük, az állatokat még további 24 óra hosszáig meleg környezetben tartottuk. Azután elpusztítottuk azokat  $\text{CO}_2$  alkalmazásával, és fejüket eltávolítottuk. Agyukat kivettük, hirtelen lefagyasztottuk (szárzjégben vagy folyékony nitrogénben), és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az agyukat felvágtuk 0,02 mm-es szeletekre, és minden 20. szeletet használtuk az azt követő analízisre. A megfelelő szeleteket „cresyl violet” alkalmazásával megfestettük (Nissl-festés). Ezzel alternatív módon TTC-t (2,3,4-trifenil-tetrazólium-klorid) is alkalmazhatunk festésre. Azután az infarktusz területét mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A pontos meghatározás céljából számítógépes szoftvert alkalmazhatunk a leképezési analízisben [J. Cereb. Blood Flow Metabol. 10, 290-293 (1990)].

**f) Szeptikus sokk**

Tíz, hím C57/BL-egérből álló csoportot (testtömegük 18-20 g) kezeltünk LPS (E. coliból származó lipopoliszacharid, LD<sub>100</sub> 20 mg/állat, i.v.) plusz galaktózaminnal (20 mg/állat, i.v.). A tesztelendő anyagot három egymást követő napon adjuk be (például 1-10 mg/kg), amelyben az első dózist 30 perccel az LPS-kezelés után adjuk be. A pusztulási arányt 12 óránként meghatározzuk. Más módszerben, az anyagot néhány dózisban adjuk be, a napokra elosztva.

**g) Megváltozott génexpresszió meghatározása öregedő sejtekben**

Sejtek öregedését úgy szimuláljuk, hogy megváltoztatjuk a sejttenyésztő tápközeget a teljes tápközeghez képest, csökkentjük a szérumkoncentrációt és azután kvantitatív PCR-el vagy Northern-blottolással analizáljuk [Linskens et al., Nucleic Acids Res. 23, 3244-51 (1995)]. A bőr öregedésének tipikus markereként például kollagént vagy elasztin alkalmazhatunk. Humán fibroblasztokat vagy fibroblaszt-sejtvonalakat alkalmazunk a bőr öregedésének szimulálására. A tápközeghez hozzáadjuk a táplálmány szerinti fehérjék modulátorait, és figyeljük hatásukat a génexpresszió változásában. Megfigyelhetjük elasztin fokozott mennyiségű termelődését a sejtekben, az öregedési folyamat lassulásával, amelyet a modulátorok okoznak.

(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)  
SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Neue Poly(ADP-ribose)polymerase-Gene

<130> M/39113-PCT

<140> PCT/EP 99/03889

<141> 1999-06-04

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1843

<212> DNA

<213> Brain

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(1715)

<223> Product= Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 1

cc atg gcg gcg cgg cgg cga cgg agc acc ggc ggc ggc agg gcg aga	47
Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg	
1 5 10 15	
gca tta aat gaa agc aaa aga gtt aat aat ggc aac acg gct cca gaa	95
Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu	
20 25 30	
gac tct tcc cct gcc aag aaa act cgt aga tgc cag aga cag gag tcg	143
Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	
35 40 45	
aaa aag atg cct gtg gct gga gga aaa gct aat aag gac agg aca gaa	191
Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	
50 55 60	
gac aag caa gat gaa tct gtg aag gcc ttg ctg tta aag ggc aaa gct	239
Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala	
65 70 75	
cct gtg gac cca gag tgt aca gcc aag gtg ggg aag gct cat gtg tat	287
Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr	
80 85 90 95	
tgt gaa gga aat gat gtc tat gat gtc atg cta aat cag acc aat ctc	335
Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu	
100 105 110	

cag ttc aac aac aac aag tac tat ctg att cag cta tta gaa gat gat 383  
 Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp  
 115 120 125

gcc cag agg aac ttc agt gtt tgg atg aga tgg ggc cga gtt ggg aaa 431  
 Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys  
 130 135 140

atg gga cag cac agc ctg gtg gct tgt tca ggc aat ctc aac aag gcc 479  
 Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala  
 145 150 155

aag gaa atc ttt cag aag aaa ttc ctt gac aaa acg aaa aac aat tgg 527  
 Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp  
 160 165 170 175

gaa gat cga gaa aag ttt gag aag gtg cct gga aaa tat gat atg cta 575  
 Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu  
 180 185 190

cag atg gac tat gcc acc aat act cag gat gaa gag gaa aca aag aaa 623  
 Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys  
 195 200 205

gag gaa tct ctt aaa tct ccc ttg aag cca gag tca cag cta gat ctt 671  
 Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu  
 210 215 220

cgg gta cag gag tta ata aag ttg atc tgt aat gtt cag gcc atg gaa 719  
 Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu  
 225 230 235

gaa atg atg atg gaa atg aag tat aat acc aag aaa gcc cca ctt ggg 767  
 Glu Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly  
 240 245 250 255

aag ctg aca gtg gca caa atc aag gca ggt tac cag tct ctt aag aag 815  
 Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys  
 260 265 270

att gag gat tgt att cgg gct ggc cag cat gga cga gct ctc atg gaa 863  
 Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu  
 275 280 285

gca tgc aat gaa ttc tac acc agg att ccg cat gac ttt gga ctc cgt 911  
 Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg  
 290 295 300

act cct cca cta atc cgg aca cag aag gaa ctg tca gaa aaa ata caa 959  
 Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln  
 305 310 315

tta cta gag gct ttg gga gac att gaa att gct att aag ctg gtg aaa 1007  
 Leu Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys  
 320 325 330 335



aca	gag	cta	caa	agc	cca	gaa	cac	cca	ttg	gac	caa	cac	tat	aga	aac	1055
Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Leu	Asp	Gln	His	Tyr	Arg	Asn	
				340					345					350		
cta	cat	tgt	gcc	ttg	cgc	ccc	ctt	gac	cat	gaa	agt	tac	gag	ttc	aaa	1103
Leu	His	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Asp	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Phe	Lys	
			355					360					365			
gtg	att	tcc	cag	tac	cta	caa	tct	acc	cat	gct	ccc	aca	cac	agc	gac	1151
Val	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Thr	His	Ala	Pro	Thr	His	Ser	Asp	
		370					375					380				
tat	acc	atg	acc	ttg	ctg	gat	ttg	ttt	gaa	gtg	gag	aag	gat	ggg	gag	1199
Tyr	Thr	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu	
	385					390					395					
aaa	gaa	gcc	ttc	aga	gag	gac	ctt	cat	aac	agg	atg	ctt	cta	tgg	cat	1247
Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	His	Asn	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	His	
400				405					410					415		
ggg	tcc	agg	atg	agt	aac	tgg	gtg	gga	atc	ttg	agc	cat	ggg	ctt	cga	1295
Gly	Ser	Arg	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Gly	Ile	Leu	Ser	His	Gly	Leu	Arg	
				420				425						430		
att	gcc	cca	cct	gaa	gct	ccc	atc	aca	ggg	tac	atg	ttt	ggg	aaa	gga	1343
Ile	Ala	Pro	Pro	Glu	Ala	Pro	Ile	Thr	Gly	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Gly	
			435				440						445			
atc	tac	ttt	gct	gac	atg	tct	tcc	aag	agt	gcc	aat	tac	tgc	ttt	gcc	1391
Ile	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ala	
		450					455					460				
tct	cgc	cta	aag	aat	aca	gga	ctg	ctg	ctc	tta	tca	gag	gta	gct	cta	1439
Ser	Arg	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	
	465					470					475					
ggg	cag	tgt	aat	gaa	cta	cta	gag	gcc	aat	cct	aag	gcc	gaa	gga	ttg	1487
Gly	Gln	Cys	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala	Glu	Gly	Leu	
480				485					490					495		
ctt	caa	ggg	aaa	cat	agc	acc	aag	ggg	ctg	ggc	aag	atg	gct	ccc	agt	1535
Leu	Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Gly	Lys	Met	Ala	Pro	Ser	
				500				505						510		
tct	gcc	cac	ttc	gtc	acc	ctg	aat	ggg	agt	aca	gtg	cca	tta	gga	cca	1583
Ser	Ala	His	Phe	Val	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	
			515					520					525			
gca	agt	gac	aca	gga	att	ctg	aat	cca	gat	ggg	tat	acc	ctc	aac	tac	1631
Ala	Ser	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Tyr	
		530					535					540				
aat	gaa	tat	att	gta	tat	aac	ccc	aac	cag	gtc	cgt	atg	cgg	tac	ctt	1679
Asn	Glu	Tyr	Ile	Val	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gln	Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Leu	
	545					550					555					

tta aag gtt cag ttt aat ttc ctt cag ctg tgg tga atgttgatat 1725  
 Leu Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp  
 560 565 570

taaataaacc agagatctga tcttcaagca agaaaataag cagtgttgta cttgtgaatt 1785

ttgtgatatt ttatgtaata aaaactgtac aggtctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1843

<210> 2  
 <211> 570  
 <212> PRT  
 <213> Brain

<400> 2

Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu Asp  
 20 25 30

Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser Lys  
 35 40 45

Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu Asp  
 50 55 60

Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala Pro  
 65 70 75 80

Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr Cys  
 85 90 95

Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu Gln  
 100 105 110

Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp Ala  
 115 120 125

Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys Met  
 130 135 140

Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala Lys  
 145 150 155 160

Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp Glu  
 165 170 175

Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu Gln  
 180 185 190

Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys Glu  
 195 200 205

Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu Arg  
 210 215 220

Val 225	Gln	Glu	Leu	Ile	Lys 230	Leu	Ile	Cys	Asn	Val 235	Gln	Ala	Met	Glu	Glu 240
Met	Met	Met	Glu	Met 245	Lys	Tyr	Asn	Thr	Lys 250	Lys	Ala	Pro	Leu	Gly 255	Lys
Leu	Thr	Val	Ala 260	Gln	Ile	Lys	Ala	Gly 265	Tyr	Gln	Ser	Leu	Lys 270	Lys	Ile
Glu	Asp	Cys 275	Ile	Arg	Ala	Gly	Gln 280	His	Gly	Arg	Ala	Leu 285	Met	Glu	Ala
Cys	Asn 290	Glu	Phe	Tyr	Thr	Arg 295	Ile	Pro	His	Asp	Phe 300	Gly	Leu	Arg	Thr
Pro 305	Pro	Leu	Ile	Arg	Thr 310	Gln	Lys	Glu	Leu	Ser 315	Glu	Lys	Ile	Gln	Leu 320
Leu	Glu	Ala	Leu	Gly 325	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala 330	Ile	Lys	Leu	Val	Lys 335	Thr
Glu	Leu	Gln	Ser 340	Pro	Glu	His	Pro	Leu 345	Asp	Gln	His	Tyr	Arg 350	Asn	Leu
His	Cys	Ala 355	Leu	Arg	Pro	Leu	Asp 360	His	Glu	Ser	Tyr	Glu 365	Phe	Lys	Val
Ile	Ser 370	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser 375	Thr	His	Ala	Pro	Thr 380	His	Ser	Asp	Tyr
Thr 385	Met	Thr	Leu	Leu	Asp 390	Leu	Phe	Glu	Val	Glu 395	Lys	Asp	Gly	Glu	Lys 400
Glu	Ala	Phe	Arg	Glu 405	Asp	Leu	His	Asn 410	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	His 415	Gly
Ser	Arg	Met	Ser 420	Asn	Trp	Val	Gly	Ile 425	Leu	Ser	His	Gly	Leu 430	Arg	Ile
Ala	Pro	Pro 435	Glu	Ala	Pro	Ile	Thr 440	Gly	Tyr	Met	Phe	Gly 445	Lys	Gly	Ile
Tyr 450	Phe	Ala	Asp	Met	Ser	Ser 455	Lys	Ser	Ala	Asn	Tyr 460	Cys	Phe	Ala	Ser
Arg 465	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly 470	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser 475	Glu	Val	Ala	Leu	Gly 480
Gln	Cys	Asn	Glu	Leu 485	Leu	Glu	Ala	Asn 490	Pro	Lys	Ala	Glu	Gly	Leu 495	Leu
Gln	Gly	Lys	His 500	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu 505	Gly	Lys	Met	Ala	Pro	Ser	Ser
Ala	His	Phe	Val	Thr	Leu	Asn	Gly 520	Ser	Thr	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala

Ser Asp Thr Gly Ile Leu Asn Pro Asp Gly Tyr Thr Leu Asn Tyr Asn  
 530 535 540

Glu Tyr Ile Val Tyr Asn Pro Asn Gln Val Arg Met Arg Tyr Leu Leu  
 545 550 555 560

Lys Val Gln Phe Asn Phe Leu Gln Leu Trp  
 565 570

<210> 3  
 <211> 2265  
 <212> DNA  
 <213> Uterus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (242)..(1843)  
 <223> Product=Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 3  
 tgggactggt cgctgactc ggctgcccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa 60  
 tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc 120  
 tctccctaata tcacgcctga ggctcatgga gagttgctag acctgggact gccttgggag 180  
 gcgcacacaaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc ttttcttggc 240  
 c atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct gag aag 289  
 Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys  
 1 5 10 15  
 aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc tcc acc 337  
 Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr  
 20 25 30  
 gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc cgc gtg 385  
 Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val  
 35 40 45  
 gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg tat gag 433  
 Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu  
 50 55 60  
 gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac aac aac 481  
 Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn  
 65 70 75 80  
 aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gac agc aac cgc ttc ttc acc 529  
 Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr  
 85 90 95  
 tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca aag atc 577  
 Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile  
 100 105 110

aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag aag aaa	625
Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys	
115 120 125	
ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac ttt gtg	673
Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val	
130 135 140	
tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag gat gag	721
Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu	
145 150 155 160	
gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg act gtg	769
Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val	
165 170 175	
act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag aag ctc	817
Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu	
180 185 190	
atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg gcc ctc	865
Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu	
195 200 205	
atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc aag caa	913
Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln	
210 215 220	
cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag gcc ctg	961
Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu	
225 230 235 240	
aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc tca cac	1009
Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser His	
245 250 255	
ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc ccg ccc	1057
Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro Pro Pro	
260 265 270	
atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg	1105
Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val	
275 280 285	
ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct gag cag	1153
Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln	
290 295 300	
gag aag acg gtg gag gag gtg cca cac ccc ctg gac cga gac tac cag	1201
Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln	
305 310 315 320	
ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct gag tac	1249
Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr	
325 330 335	



aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac agg tgc 1297  
Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His Arg Cys  
340 345 350

cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag gaa gac 1345  
Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp  
355 360 365

aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg tgg cat 1393  
Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu Trp His  
370 375 380

ggc acc aac atg gcc gtg gtg gcc gcc atc ctc act agt ggg ctc cgc 1441  
Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg  
385 390 395 400

atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac ttt gcc 1489  
Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala  
405 410 415

tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag tgt ggg 1537  
Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly  
420 425 430

gcc cac cat gtc gcc tac atg ttc ctg ggt gag gtg gcc ctg gcc aga 1585  
Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg  
435 440 445

gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca cct cct 1633  
Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro  
450 455 460

ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat ccg acc 1681  
Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr  
465 470 475 480

cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtg gtg gtg ccc cag 1729  
Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln  
485 490 495

ggc cag cct gtg ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc tcc cag 1777  
Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln  
500 505 510

agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg 1825  
Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu  
515 520 525

ctg gag gtc cac ctc tga gtgccccgcc tgtcccccg ggtcctgcaa 1873  
Leu Glu Val His Leu  
530

ggctggactg tgatcttcaa tcacctgccc catctctggt acccctatat cactcctttt 1933

tttcaagaat acaatacgtt gttgtaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993



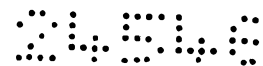
cttatgcctc ctaactgaaa ttttgtattc tttgacacat ctgcccagtc cctctcctcc 2053  
 cagcccatgg taaccagcat ttgactcttt acttgtataa gggcagcttt tataggttcc 2113  
 acatgtaagt gagatcatgc agtgtttgc tttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173  
 aatgtgcacc gggttcaccc atgttttcat aatgacaag atttcctcct ttaaaaaaaaa 2233  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa 2265

<210> 4  
 <211> 533  
 <212> PRT  
 <213> Uterus

<400> 4  
 Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr  
 20 25 30  
 Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val  
 35 40 45  
 Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu  
 50 55 60  
 Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr  
 85 90 95  
 Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile  
 100 105 110  
 Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys  
 115 120 125  
 Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe Val  
 130 135 140  
 Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr Val  
 165 170 175  
 Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu  
 180 185 190  
 Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala Leu  
 195 200 205



Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	Gln
	210					215					220				
Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu
225					230					235					240
Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	His
				245					250					255	
Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro	Pro
			260					265					270		
Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val
		275					280					285			
Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu	Gln
	290					295					300				
Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln
305					310					315					320
Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu	Tyr
				325					330					335	
Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Asn	His	Arg	Cys
			340					345					350		
Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Glu	Asp
		355					360					365			
Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Trp	His
	370					375					380				
Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg
385					390					395					400
Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala
				405					410					415	
Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Met	Lys	Cys	Gly
			420					425					430		
Ala	His	His	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Arg
		435					440					445			
Glu	His	His	Ile	Asn	Thr	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Pro	Pro
	450					455					460				
Gly	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro	Thr
465					470					475					480
Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Gln	Gln	Val	Val	Val	Pro	Gln
				485					490					495	
Gly	Gln	Pro	Val	Pro	Cys	Pro	Glu	Phe	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln
			500					505					510		



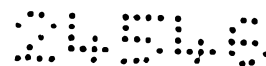
Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu  
 515 520 525

Leu Glu Val His Leu  
 530

<210> 5  
 <211> 2265  
 <212> DNA  
 <213> Uterus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (221)..(1843)  
 <223> Product=Poly ADP Ribose Polymerase

<400> 5  
 tgggactggg cgctgactc ggctgcccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa 60  
 tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc 120  
 tctccctaata tcacgcctga ggctcatgga gagttgctag acctgggact gcctggggag 180  
 gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atg tcc ctg ctt ttc 235  
 Met Ser Leu Leu Phe  
 1 5  
 ttg gcc atg gct cca aag ccg aag ccc tgg gta cag act gag ggc cct 283  
 Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro  
 10 15 20  
 gag aag aag aag ggc cgg cag gca gga agg gag gag gac ccc ttc cgc 331  
 Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg  
 25 30 35  
 tcc acc gct gag gcc ctc aag gcc ata ccc gca gag aag cgc ata atc 379  
 Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile  
 40 45 50  
 cgc gtg gat cca aca tgt cca ctc agc agc aac ccc ggg acc cag gtg 427  
 Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val  
 55 60 65  
 tat gag gac tac aac tgc acc ctg aac cag acc aac atc gag aac aac 475  
 Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn  
 70 75 80 85  
 aac aac aag ttc tac atc atc cag ctg ctc caa gac agc aac cgc ttc 523  
 Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe  
 90 95 100  
 ttc acc tgc tgg aac cgc tgg ggc cgt gtg gga gag gtc ggc cag tca 571  
 Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser  
 105 110 115



aag atc aac cac ttc aca agg cta gaa gat gca aag aag gac ttt gag 619  
Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu  
120 125 130

aag aaa ttt cgg gaa aag acc aag aac aac tgg gca gag cgg gac cac 667  
Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His  
135 140 145

ttt gtg tct cac ccg ggc aag tac aca ctt atc gaa gta cag gca gag 715  
Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu  
150 155 160 165

gat gag gcc cag gaa gct gtg gtg aag gtg gac aga ggc cca gtg agg 763  
Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg  
170 175 180

act gtg act aag cgg gtg cag ccc tgc tcc ctg gac cca gcc acg cag 811  
Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln  
185 190 195

aag ctc atc act aac atc ttc agc aag gag atg ttc aag aac acc atg 859  
Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met  
200 205 210

gcc ctc atg gac ctg gat gtg aag aag atg ccc ctg gga aag ctg agc 907  
Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser  
215 220 225

aag caa cag att gca cgg ggt ttc gag gcc ttg gag gcg ctg gag gag 955  
Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu  
230 235 240 245

gcc ctg aaa ggc ccc acg gat ggt ggc caa agc ctg gag gag ctg tcc 1003  
Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser  
250 255 260

tca cac ttt tac acc gtc atc ccg cac aac ttc ggc cac agc cag ccc 1051  
Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro  
265 270 275

ccg ccc atc aat tcc cct gag ctt ctg cag gcc aag aag gac atg ctg 1099  
Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu  
280 285 290

ctg gtg ctg gcg gac atc gag ctg gcc cag gcc ctg cag gca gtc tct 1147  
Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser  
295 300 305

gag cag gag aag acg gtg gag gag gtg cca cac ccc ctg gac cga gac 1195  
Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp  
310 315 320 325

tac cag ctt ctc aag tgc cag ctg cag ctg cta gac tct gga gca cct 1243  
Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro  
330 335 340



gag tac aag gtg ata cag acc tac tta gaa cag act ggc agc aac cac 1291  
 Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His  
 345 350 355

agg tgc cct aca ctt caa cac atc tgg aaa gta aac caa gaa ggg gag 1339  
 Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu  
 360 365 370

gaa gac aga ttc cag gcc cac tcc aaa ctg ggt aat cgg aag ctg ctg 1387  
 Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu  
 375 380 385

tgg cat ggc acc aac atg gcc gtg gtg gcc gcc atc ctc act agt ggg 1435  
 Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly  
 390 395 400 405

ctc cgc atc atg cca cat tct ggt ggg cgt gtt ggc aag ggc atc tac 1483  
 Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr  
 410 415 420

ttt gcc tca gag aac agc aag tca gct gga tat gtt att ggc atg aag 1531  
 Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys  
 425 430 435

tgt ggg gcc cac cat gtc ggc tac atg ttc ctg ggt gag gtg gcc ctg 1579  
 Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu  
 440 445 450

ggc aga gag cac cat atc aac acg gac aac ccc agc ttg aag agc cca 1627  
 Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro  
 455 460 465

cct cct ggc ttc gac agt gtc att gcc cga ggc cac acc gag cct gat 1675  
 Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp  
 470 475 480 485

ccg acc cag gac act gag ttg gag ctg gat ggc cag caa gtg gtg gtg 1723  
 Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val  
 490 495 500

ccc cag ggc cag cct gtg ccc tgc cca gag ttc agc agc tcc aca ttc 1771  
 Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe  
 505 510 515

tcc cag agc gag tac ctc atc tac cag gag agc cag tgt cgc ctg cgc 1819  
 Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg  
 520 525 530

tac ctg ctg gag gtc cac ctc tga gtgccccccc tgtccccccgg ggtcctgcaa 1873  
 Tyr Leu Leu Glu Val His Leu  
 535 540

ggctggactg tgatcttcaa tcatctgccc catctctggt acccctatat cactcctttt 1933

tttcaagaat acaatagtt gttgtaact atagtcacca tgctgtacaa gatccctgaa 1993

cttatgcctc ctaactgaaa ttttgattc tttgacacat ctgcccagtc cctctcctcc 2053



cagcccatgg taaccagcat ttgactcttt acttgataa gggcagcttt tataggttcc 2113  
 acatgtaagt gagatcatgc agtgtttgtc tttctgtgcc tggcttattt cactcagcat 2173  
 aatgtgcacc gggttcaccc atgttttcat aaatgacaag atttcctcct ttaaaaaaaaa 2233  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2265

<210> 6  
 <211> 540  
 <212> PRT  
 <213> Uterus

<400> 6

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



Leu Gly Lys Leu Ser Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Leu Glu Glu Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser  
 245 250 255  
 Leu Glu Glu Leu Ser Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe  
 260 265 270  
 Gly His Ser Gln Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala  
 275 280 285  
 Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala  
 290 295 300  
 Leu Gln Ala Val Ser Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His  
 305 310 315 320  
 Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu  
 325 330 335  
 Asp Ser Gly Ala Pro Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln  
 340 345 350  
 Thr Gly Ser Asn His Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val  
 355 360 365  
 Asn Gln Glu Gly Glu Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly  
 370 375 380  
 Asn Arg Lys Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val  
 405 410 415  
 Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr  
 420 425 430  
 Val Ile Gly Met Lys Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu  
 435 440 445  
 Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro  
 450 455 460  
 Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly  
 465 470 475 480  
 His Thr Glu Pro Asp Pro Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly  
 485 490 495  
 Gln Gln Val Val Val Pro Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe  
 500 505 510  
 Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser  
 515 520 525



Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Val His Leu  
 530 535 540

<210> 7  
 <211> 1740  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (112)..(1710)

<400> 7  
 cccggcttc actttttctg ctgcctcggg gaacacctcg agccaactgc ttcctaactc 60

aggggtgggca gaactgacgg gatctaagct tctgcatctc tgaggagaac c atg gct 117  
 Met Ala  
 1

cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag cag cga 165  
 Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys Gln Arg  
 5 10 15

caa ggg aca gag gag gag gac agc ttc cgg tcc act gcc gag gct ctc 213  
 Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu  
 20 25 30

aga gca gca cct gct gat aat cgg gtc atc cgt gtg gac ccc tca tgt 261  
 Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys  
 35 40 45 50

cca ttc agc cgg aac ccc ggg ata cag gtc cac gag gac tat gac tgt 309  
 Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys  
 55 60 65

acc ctg aac cag acc aac atc ggc aac aac aac aac aag ttc tat att 357  
 Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile  
 70 75 80

atc caa ctg ctg gag gag ggt agt cgc ttc ttc tgc tgg aat cgc tgg 405  
 Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp  
 85 90 95

ggc cgc gtg gga gag gtg ggc cag agc aag atg aac cac ttc acc tgc 453  
 Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys  
 100 105 110

ctg gaa gat gca aag aag gac ttt aag aag aaa ttt tgg gag aag act 501  
 Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr  
 115 120 125 130

aaa aac aaa tgg gag gag cgg gac cgt ttt gtg gcc cag ccc aac aag 549  
 Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys  
 135 140 145



tac	aca	ctt	ata	gaa	gtc	cag	gga	gaa	gca	gag	agc	caa	gag	gct	gta	597
Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Val	
		150						155					160			
gtg	aag	gcc	tta	tct	ccc	cag	gtg	gac	agc	ggc	cct	gtg	agg	acc	gtg	645
Val	Lys	Ala	Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val	
		165					170					175				
gtc	aag	ccc	tgc	tcc	cta	gac	cct	gcc	acc	cag	aac	ctt	atc	acc	aac	693
Val	Lys	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	
	180					185					190					
atc	ttc	agc	aaa	gag	atg	ttc	aag	aac	gca	atg	acc	ctc	atg	aac	ctg	741
Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	
195					200				205						210	
gat	gtg	aag	aag	atg	ccc	ttg	gga	aag	ctg	acc	aag	cag	cag	att	gcc	789
Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	
				215					220					225		
cgt	ggc	ttc	gag	gcc	ttg	gaa	gct	cta	gag	gag	gcc	atg	aaa	aac	ccc	837
Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys	Asn	Pro	
			230					235					240			
aca	ggg	gat	ggc	cag	agc	ctg	gaa	gag	ctc	tcc	tcc	tgc	ttc	tac	act	885
Thr	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe	Tyr	Thr	
		245					250					255				
gtc	atc	cca	cac	aac	ttc	ggc	cgc	agc	cga	ccc	ccg	ccc	atc	aac	tcc	933
Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	
	260					265					270					
cct	gat	gtg	ctt	cag	gcc	aag	aag	gac	atg	ctg	ctg	gtg	cta	gcg	gac	981
Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	
275					280					285					290	
atc	gag	ttg	gcg	cag	acc	ttg	cag	gca	gcc	cct	ggg	gag	gag	gag	gag	1029
Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	
				295				300						305		
aaa	gtg	gaa	gag	gtg	cca	cac	cca	ctg	gat	cga	gac	tac	cag	ctc	ctc	1077
Lys	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	
			310					315					320			
agg	tgc	cag	ctt	caa	ctg	ctg	gac	tcc	ggg	gag	tcc	gag	tac	aag	gca	1125
Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ala	
		325					330					335				
ata	cag	acc	tac	ctg	aaa	cag	act	ggc	aac	agc	tac	agg	tgc	cca	aac	1173
Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Asn	
	340					345					350					
ctg	cgg	cat	gtt	tgg	aaa	gtg	aac	cga	gaa	ggg	gag	gga	gac	agg	ttc	1221
Leu	Arg	His	Val	Trp	Lys	Val	Asn	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Arg	Phe	
355					360					365					370	



cag gcc cac tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc 1269  
 Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr  
 375 380 385

aat gtg gcc gtg gtg gct gcc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg 1317  
 Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met  
 390 395 400

cca cac tcg ggt ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag 1365  
 Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu  
 405 410 415

aac agc aag tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgt ggg ggc cac 1413  
 Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His  
 420 425 430

cag gtg ggc tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac 1461  
 Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His  
 435 440 445 450

cac atc acc atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt 1509  
 His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe  
 455 460 465

gac agc gtc atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac 1557  
 Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp  
 470 475 480

att gaa ctt gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg gtg ccc caa ggc ccg 1605  
 Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro  
 485 490 495

cct gtg cag tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa 1653  
 Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu  
 500 505 510

tac ctc ata tac aag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg ctg gag 1701  
 Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu  
 515 520 525 530

att cac ctc taagctgctt gccctcccta ggtccaagcc 1740  
 Ile His Leu

<210> 8  
 <211> 533  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 8  
 Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu  
 20 25 30



Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro  
                   35                                  40                                  45  
 Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr  
           50                                  55                                  60  
 Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn  
                   85                                  90  
 Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe  
                   100                                  105                                  110  
 Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu  
           115                                  120  
 Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro  
           130                                  135                                  140  
 Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu  
   145                                  150                                  155                                  160  
 Ala Val Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg  
                   165                                  170                                  175  
 Thr Val Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile  
                   180                                  185                                  190  
 Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met  
           195                                  200                                  205  
 Asn Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln  
   210                                  215                                  220  
 Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys  
   225                                  230                                  235                                  240  
 Asn Pro Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe  
                   245                                  250                                  255  
  
 Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile  
                   260                                  265                                  270  
 Asn Ser Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu  
           275                                  280                                  285  
 Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu  
           290                                  295                                  300  
 Glu Glu Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln  
   305                                  310                                  315                                  320



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

<210> 9  
 <211> 1587  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1584)

<400> 9  
 atg gct cca aaa cga aag gcc tct gtg cag act gag ggc tcc aag aag 48  
 Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys  
 1 5 10 15





ggc cag agc ctg gaa gag ctc tcc tcc tgc ttc tac act gtc atc cca	768
Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro	
245 250 255	
cac aac ttc ggc cgc agc cga ccc ccg ccc atc aac tcc cct gat gtg	816
His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val	
260 265 270	
ctt cag gcc aag aag gac atg ctg ctg gtg cta gcg gac atc gag ttg	864
Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu	
275 280 285	
gcg cag acc ttg cag gca gcc cct ggg gag gag gag gag aaa gtg gaa	912
Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu	
290 295 300	
gag gtg cca cac cca ctg gat cga gac tac cag ctc ctc agg tgc cag	960
Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln	
305 310 315 320	
ctt caa ctg ctg gac tcc ggg gag tcc gag tac aag gca ata cag acc	1008
Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr	
325 330 335	
tac ctg aaa cag act ggc aac agc tac agg tgc cca aac ctg cgg cat	1056
Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His	
340 345 350	
gtt tgg aaa gtg aac cga gaa ggg gag gga gac agg ttc cag gcc cac	1104
Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His	
355 360 365	
tcc aaa ctg ggc aat cgg agg ctg ctg tgg cac ggc acc aat gtg gcc	1152
Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala	
370 375 380	
gtg gtg gct gcc atc ctc acc agt ggg ctc cga atc atg cca cac tcg	1200
Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser	
385 390 395 400	
ggt ggt cgt gtt ggc aag ggt att tat ttt gcc tct gag aac agc aag	1248
Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys	
405 410 415	
tca gct ggc tat gtt acc acc atg cac tgt ggg ggc cac cag gtg ggc	1296
Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly	
420 425 430	
tac atg ttc ctg ggc gag gtg gcc ctc ggc aaa gag cac cac atc acc	1344
Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr	
435 440 445	
atc gat gac ccc agc ttg aag agt cca ccc cct ggc ttt gac agc gtc	1392
Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val	
450 455 460	



atc gcc cga ggc caa acc gag ccg gat ccc gcc cag gac att gaa ctt 1440  
 Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu  
 465 470 475 480

gaa ctg gat ggg cag ccg gtg gtg gtg ccc caa ggc ccg cct gtg cag 1488  
 Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln  
 485 490 495

tgc ccg tca ttc aaa agc tcc agc ttc agc cag agt gaa tac ctc ata 1536  
 Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile  
 500 505 510

tac aag gag agc cag tgt cgc ctg cgc tac ctg ctg gag att cac ctc 1584  
 Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu  
 515 520 525

taa 1587

<210> 10

<211> 528

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys  
 1 5 10 15

Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu  
 20 25 30

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro  
 35 40 45

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr  
 50 55 60

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe  
 65 70 75 80

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn  
 85 90 95

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe  
 100 105 110

Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu  
 115 120 125

Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro  
 130 135 140

Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu  
 145 150 155 160



Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val	Val	Lys	Pro
				165					170					175	
Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser
			180					185					190		
Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	Asp	Val	Lys
		195					200					205			
Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe
	210					215					220				
Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys	Asn	Pro	Thr	Gly	Asp
225					230					235					240
Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro
				245					250					255	
His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Asp	Val
			260					265					270		
Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu
		275					280					285			
Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Val	Glu
	290					295					300				
Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Gln
305					310					315					320
Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gln	Thr
				325					330					335	
Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Asn	Leu	Arg	His
			340					345					350		
Val	Trp	Lys	Val	Asn	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	His
		355					360					365			
Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Arg	Leu	Leu	Trp	His	Gly	Thr	Asn	Val	Ala
	370					375					380				
Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Met	Pro	His	Ser
385					390					395					400
Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys
				405					410					415	
Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	Met	His	Cys	Gly	Gly	His	Gln	Val	Gly
			420					425					430		
Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Lys	Glu	His	His	Ile	Thr
		435					440					445			
Ile	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly	Phe	Asp	Ser	Val
	450					455					460				



Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu  
 465 470 475 480

Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln  
 485 490 495

Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile  
 500 505 510

Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu  
 515 520 525

<210> 11  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (2)  
 <223> Xaa is 1 to 5 other amino acids

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (3)  
 <223> Xaa is Thr or Ser

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 11  
 Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (1)  
 <223> Xaa is Ser or Thr

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (6)  
 <223> Xaa is Ile or Val

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (9)  
 <223> Xaa is 1 to 5 other amino acids







<210> 16  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 16  
 Ala Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Thr Xaa Asn Xaa  
 1 5 10 15  
 Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Lys  
 20 25

<210> 17  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (4)  
 <223> Xaa is Ile or Leu

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 17  
 Gln Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15  
 Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Gly Lys Leu  
 20 25 30  
 Xaa Xaa Xaa Gln Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu  
 35 40

<210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 18  
 Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro  
 1 5 10 15

<210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 19  
 Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Leu

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 20  
 Gly Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Glu Val Ala Leu Gly  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (14)  
 <223> Xaa is 7 to 9 other amino acids

<400> 21  
 Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Xaa  
 1 5 10 15

Gly Xaa Xaa Val  
 20



<210> 22  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<220>  
 <221> SITE  
 <222> (2)  
 <223> Xaa is Tyr or Phe

<400> 22  
 Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Leu  
 1 5 10 15

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 23  
 Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala  
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser  
 20

<210> 24  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 24  
 Lys Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg  
 1 5 10 15

Asn Leu His Cys  
 20

<210> 25  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz



<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 25

Cys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr  
 1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Lys  
 20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 26

Cys Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu  
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys  
 20

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 27

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Ala Leu Lys

<210> 28

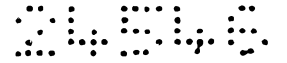
<211> 19

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

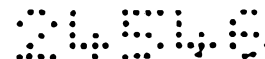
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide



<400> 28

Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu  
1 5 10 15

Ala Met Lys



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Emberből vagy nem-emberi emlősszervezetből származó poli-(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) homológ, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely

a) funkcionális NAD<sup>+</sup>-kötődoménnel rendelkezik, és

b) nem rendelkezik az alábbi általános képletű PARP „cink-finger” szekvencia-motívummal:



amelyben

m jelentése 28-nál vagy 30-nál nagyobb, egész szám, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav.

2. Az 1. igénypont szerinti PARP-homológ, amelyben a funkcionális NAD<sup>+</sup>-kötődomén az alábbi, általánosan előforduló szekvencia-motívumokkal rendelkezik:

$\text{PX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFA}$ ,

$(\text{S/T})\text{XGLR}(\text{I/V})\text{XPX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFA}$ , vagy

$\text{LLWHG}(\text{S/T})\text{X}_7\text{IL}(\text{S/T})\text{XGLR}(\text{I/V})\text{XPX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFAX}_3\text{SKSAXY}$

amelyben n jelentése 1 és 5 közötti egész szám, és X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav.

3. Az előző igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológ, amely az alábbi rész-szekvenciamotívumok közül legalább egyet tartalmaz:

$\text{LX}_9\text{NX}_2\text{YX}_2\text{QLLX}(\text{D/E})\text{X}_b\text{WGRVG}$ ,

$\text{AX}_3\text{FXKX}_4\text{KTXNXWX}_5\text{FX}_3\text{PKK}$ ,

$\text{QXL}(\text{I/L})\text{X}_2\text{IX}_9\text{MX}_{10}\text{PLGKLX}_3\text{QIX}_6\text{L}$ ,

$\text{FYTXIPHFXGX}_3\text{PP}$ , és



### KX<sub>3</sub>LX<sub>2</sub>LXDIEXAX<sub>2</sub>L

amelyben X-gyökök jelentése, egymástól függetlenül, bármilyen aminosav.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológ, amely például olyan humán PARP-homológ, amely 2. (humán PARP2), 4. vagy 6. (humán PARP3 1. vagy 2. típusa) számú aminosav-szekvenciával rendelkezik; vagy olyan rágcsálóból származó PARP-homológ, amely 8. (egérből származó hosszú forma) vagy 10. (egérből származó rövid forma) számú aminosav-szekvenciával rendelkezik.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológokra specifikus kötőpartner, amely például

- a) antitest és fragmentumai,
- b) fehérjeszerű vegyület, amelyek a fehérje rész-szekvenciájával kölcsönhatást képes létesíteni, és
- c) kis molekulatömegű effektor, amely képes katalitikus PARP-aktivitást modulálni, azaz NAD<sup>+</sup>-fogyasztó ADP-ribozilálást, vagy aktivátor fehérjéhez vagy DNS-hez való kötődést.

6. Nukleinsav, amely:

- a) legalább egy, 1-4. igénypont szerinti PARP-homológot kódoló nukleotidszekvenciát, vagy ezzel komplementer nukleotid-szekvenciát;
- b) az a)-pontban meghatározott szekvenciához, előnyösen sztringens körülmények között hibridizálódni képes nukleotid-szekvenciát; vagy
- c) az a)- és b)-pontban definiált nukleotidszekvenciákból, a genetikai kód degeneráltsága következtében származtatható



nukleotid-szekvenciákat

tartalmaz.

7. A 6. igénypont szerinti nukleinsav, amely

a) az 1. számú szekvencia +3. nukleotidja és +1715. nukleotidja közötti nukleotidokat;

b) a 3. számú szekvencia +242. nukleotidja és +1843. nukleotidja közötti nukleotidokat;

c) a 5. számú szekvencia +221. nukleotidja és +1843. nukleotidja közötti nukleotidokat;

d) a 7. számú szekvencia +112. nukleotidja és +1710. nukleotidja közötti nukleotidokat; vagy

e) a 9. számú szekvencia +1. nukleotidja és +1584. nukleotidja közötti nukleotidokat

tartalmaz.

8. Expressziós kazetta, amely 6. vagy 7. igénypont szerinti nukleotidszekvenciák bármelyikét tartalmazza legalább egy, szabályzó nukleotidszekvencia genetikai kontrollja alatt.

9. Rekombináns vektor, amely legalább egy, 8. igénypont szerinti expressziós kazettát tartalmaz.

10. Rekombináns mikroorganizmus, amely legalább egy, 9. igénypont szerinti rekombináns vektort tartalmaz.

11. Transzgenikus emlősszervezet, amely 9. igénypont szerinti vektort tartalmaz.

12. PARP-deficiens emlősszervezet vagy PARP-deficiens eukarióta sejt, amelyben legalább egy, 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológot kódoló gén funkcionális expressziója gátolva van.

13. Eljárás PARP-inhibitorok in vitro detektálására, *azzal jellemezve, hogy*

a) hordozóhoz immobilizált vagy hordozómentes poli-ADP-ribozilálható célt inkubálunk egy olyan reakciókeverékkel, amely

a1) 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológot;

a2) PARP-aktivátort; és

a3) PARP-inhibítort vagy olyan analizálandó anyagot tartalmaz, amelyben feltételezzük, hogy legalább egy PARP-inhibitor van;

b) végrehajtjuk a poli-ADP-ribozilálási reakciót; és

c) kvalitatíve vagy kvantitatíve meghatározzuk a cél poli-ADP-riboziláltságot.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy* a poli-ADP-ribozilálási reakció elvégzése előtt a PARP-homológot előinkubáljuk a PARP-aktivátorral és a PARP-inhibitorral vagy olyan analizálandó anyaggal, amelyről feltételezzük, hogy legalább egy PARP-inhibítort tartalmaz.

15. A 13. és 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy* poli-ADP-ribozilálható célként hiszton-fehérjét alkalmazunk.

16. A 13-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy* PARP-aktivátorként aktivált DNS-t alkalmazunk.

17. A 13-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve, hogy* a poli-ADP-ribozilálási reakciót  $\text{NAD}^+$  hozzáadásával indítjuk.

18. A 13-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal*

jellemezve, hogy a hordozóhoz immobilizált cél poli-ADP-ribozilálását anti-poli-(ADP-ribóz)-antitest alkalmazásával határozzuk meg.

19. A 13-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hordozóhoz nem immobilizált célt akceptor fluorofórral megjelöljük.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hordozóhoz nem immobilizált cél poli-ADP-ribozilálását olyan donor fluorofórral megjelölt anti-poli-(ADP-ribóz)-antitest alkalmazásával határozzuk meg, amely képes energiát transzferálni az akceptor fluorofórhoz.

21. A 19. és 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy célként biotinilált hisztont alkalmazunk, és az akceptor fluorofórt ehhez kapcsoljuk avidinon vagy sztrepavidinon keresztül.

22. A 20. és 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anti-poli-(ADP-ribóz)-antitestet donor fluorofórként eurórium-kriptáttal megjelöljük.

23. Eljárás PARP-molekula kötőpartnereinek in vitro szűrésére, azzal jellemezve, hogy

a1) legalább egy, 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológot immobilizálunk hordozóra;

b1) az immobilizált PARP-homológot olyan analizálandó anyaggal érintkeztetjük, amelyről feltételezzük, hogy legalább egy kötőpartnert tartalmaz; és

c1) adott esetben megfelelő inkubációs idő után, meghatározzuk az immobilizált PARP-homológhoz kötődött, analizálandó alko-

tórészeket;

vagy

a2) egy hordozóra olyan analizálandó anyagot immobilizálunk, amely PARP-homológ legalább egy lehetséges kötőpartnerét tartalmazza;

b2) érintkeztetjük az immobilizált analizálandó anyagot legalább egy, 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológgal, amelyről feltételezzük, hogy kötőpartner; és

c2) adott esetben megfelelő inkubációs idő után, megvizsgáljuk az immobilizált analizálandó anyagot, hogy kötötte-e a PARP-homológot.

24. Eljárás 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológot kódoló nukleinsavak kvalitatív vagy kvantitatív meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy

a) egy biológiai mintát inkubálunk meghatározott mennyiségű, 6. és 7. igénypont szerinti, exogén nukleinsavval, sztringens körülmények között hibridizáltatjuk, meghatározzuk a hibridizált nukleinsavakat, és adott esetben összehasonlítjuk egy standarddel; vagy

b) egy biológiai mintát meghatározott mennyiségű, PARP-homológot kódoló nukleinsavra specifikus oligonukleotid primerpárral inkubálunk, amplifikáljuk a nukleinsavat, meghatározzuk az amplifikációs terméket, és adott esetben összehasonlítjuk egy standarddel.

25. Eljárás az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológ kvalitatív vagy kvantitatív meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy

a) egy biológiai mintát inkubálunk legalább egy, PARP-homológra specifikus kötőpartnerrel,

b) detektáljuk a kötőpartner/PARP-komplexet, és adott esetben

c) az eredményt összehasonlítjuk egy standarddel.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kötőpartnerként adott esetben detektálható jelölőt tartalmazó antitestet vagy annak kötésre képes fragmentumát alkalmazzuk.

27. A 24-26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy energiadeficit által mediált betegséget diagnosztizálunk.

28. Eljárás PARP-effektorok hatékonyságának meghatározására, *azzal jellemezve*, hogy

a) 1-4. igénypontok bármelyike szerinti PARP-homológot olyan analizálandó anyaggal inkubáljuk, amely PARP-aktivitás fiziológiai vagy patológiai effektorát tartalmazza; adott esetben ismét eltávolítjuk az effektort; és

b) meghatározzuk a PARP-homológ aktivitását, adott esetben szubsztrátok vagy koszubsztrátok hozzáadása után.

29. Génterápiás készítmény, amely génterápiára elfogadható segédanyagban olyan nukleinsavkonstrukciót tartalmaz, amely

a) 6. és 7. igénypont szerinti kódoló nukleinsavra specifikus, antiszensz nukleinsavat tartalmaz; vagy

b) 6. és 7. igénypont szerinti nem-kódoló nukleinsavra specifikus ribozimot tartalmaz; vagy

c) specifikus PARP-inhibitort kódol.

30. Gyógyászati készítmény, amely gyógyászatilag elfogadható segédanyagban legalább egy, 1-4. igénypontok bármelyike szerinti

PARP-fehérjét, legalább egy, 5. igénypont szerinti PARP-kötőpartnert vagy legalább egy, 6. vagy 7. igénypont szerinti kódoló nukleotidszekvenciát tartalmaz.

31. Az 5. igénypont szerinti, alacsony molekulatömegű PARP-kötőpartnerek alkalmazása olyan patológiai állapotok diagnózisára vagy terápiájára szolgáló gyógyászati ágens előállítására, amelyek kifejlődésében és/vagy súlyosbodásában legalább egy PARP-fehérje, vagy ezekből származó polipeptid szerepet játszik.

32. Az 5. igénypont szerinti, alacsony molekulatömegű PARP-kötőpartnerek alkalmazása energiadeficit által mediált patológiai állapotok diagnózisára vagy terápiájára szolgáló gyógyászati ágens előállítására.

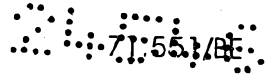
A meghatalmazott:

Magyarországi  
 Patentszolgálat  
 HYP & HYP-Értékesítő  
 Budapest, Magyarországon  
 1045 Budapest, Magyarországon  
 telefon: 06 1 462 1000

113 + 7 = 120 oldal

OK P

2000.04.22.

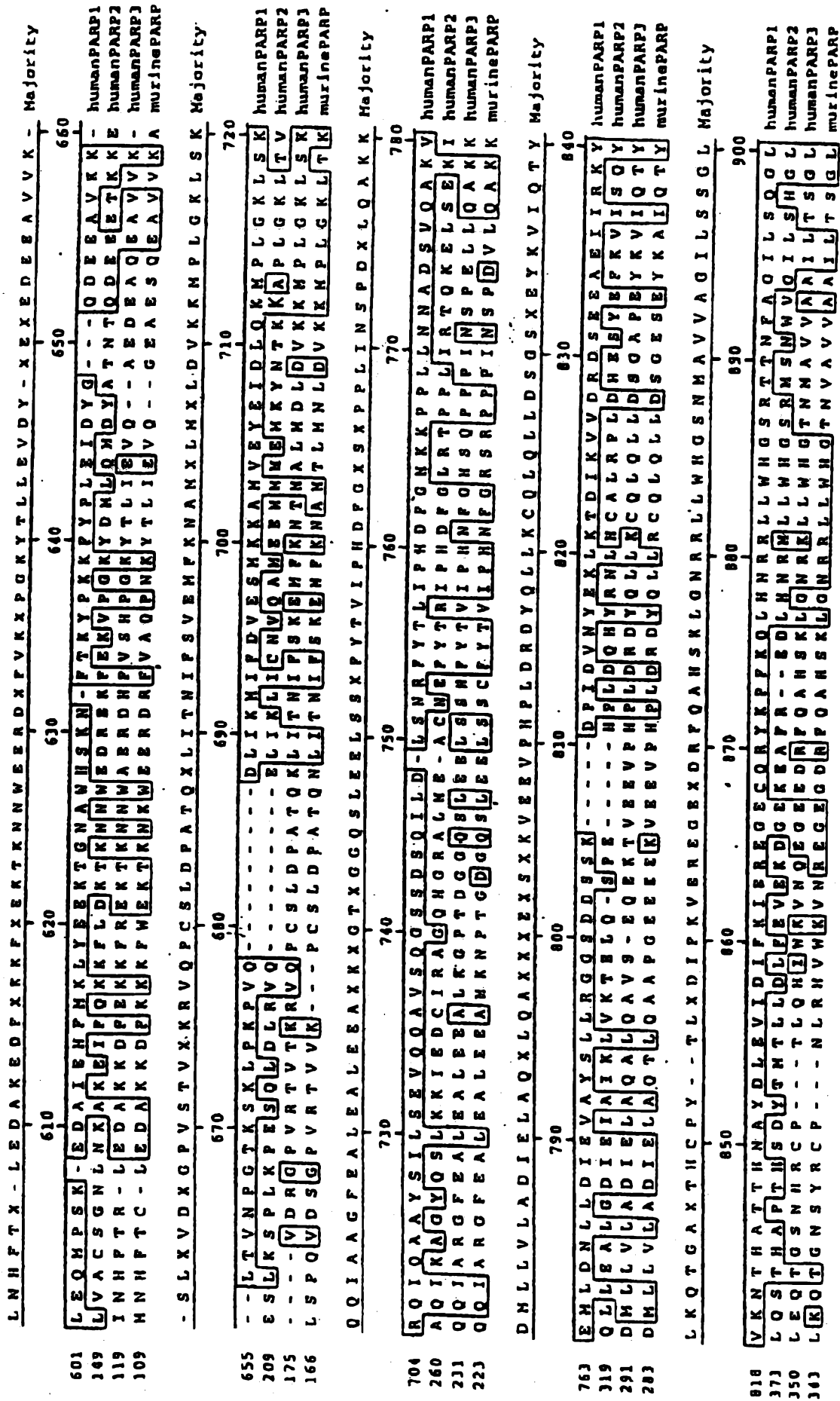


	10	20	30	40	50	60	Majority
1	M A E S S D K L Y R V E Y A K S E R A S C K K C S E S I P K D S L R M A I H V Q S P H F D G K V P H W Y H P S C F W K V						humanPARP1
1	M A A R						humanPARP2
1	H S						humanPARP3
1	M						murinePARP
	70	80	90	100	110	120	Majority
61	G H S I R H P D V E V D G F S E L R W D D O O K K V K K T A E A G G V T G K G O D G I G S K A E K T L Q D F A A E Y A X S						humanPARP1
5							humanPARP2
3							humanPARP3
2							murinePARP
	130	140	150	160	170	180	Majority
121	N R S T C K G C H E K I E K G Q V R L S K K H V D P E K P Q L G H I D R W Y H P G C F V K K R R E E L Q P R P E Y S A S O						humanPARP1
20							humanPARP2
3							humanPARP3
2							murinePARP
	190	200	210	220	230	240	Majority
181	L K G F S L L A T E D R E A L K K Q L P O V K S E G K R K G D K V D G V D E V A K K K S K K E K D K D S K L E K A L K A						humanPARP1
43							humanPARP2
3							humanPARP3
2							murinePARP
	250	260	270	280	290	300	Majority
211	Q N D L I W N I K D E L K K V C S T N D L K E L L I F N K Q O V P E G E S A I L D R V A D G M V F G A L L P C E E C S O						humanPARP1
68							humanPARP2
3							humanPARP3
2							murinePARP

1(1). ábra

	Y C G	A P K R K X W			Q Majority
	310	320	330	340	350
301	Q L V F K S D A Y Y C T G D V T A W T K C M V K T Q T P N R K K E M V T P K E F R E I S Y L K K L K V K K Q D R I F P P E				360
88	K V G - - K A H V Y C E G N				humanPARP1
9	- - - A P K P K P W V				humanPARP2
2	- - - A P K R K A S V				humanPARP3
					Q murinePARP
	T E G S				Majority
	370	380	390	400	410
361	T S A S V A A T P P P S T A S A P A A V N S S A S A D K P L S N H K I L T L Q K L S R N K K D E V K A M I E K L G G K L T				420
100	T E G P				humanPARP1
18	T E G S				humanPARP2
11	- - - E K K K X R O X X E E D X P R S T A E A L				humanPARP3
					murinePARP
					Majority
	430	440	450	460	470
421	G T A N K A S L C I S T K K E V E K H N K K M E V K S A N I R V V S E D F L Q D V S A S T K S L Q E L F L A H I L S P				480
100	- - - E K K K O R O A O R E E D P P R S T A E A L				humanPARP1
22	- - - K K Q R O O T E E E D S F R S T A E A L				humanPARP2
15	- - - K A X P A E X R X I R V D P X C P L S X N P O X Q V X E D				humanPARP3
					murinePARP
					Majority
	490	500	510	520	530
481	W G A E V K A E P V E V V A P R G E S G A A L S K K S K G Q V K E E G I N K S E K R H K L T L K G G A A V D P D S G L E				540
100	- - - K A I P A E K R I R V D P T C P L S S N P G T O V Y E D				humanPARP1
44	- - - R A A P A D N R V I R V D P S C P P I S R N P G I Q V H E D				humanPARP2
35	- - - V Y D C T L N Q T N I X N N N N K P Y I I O L L E D D X - R P F X C W N R W G R V G E - V G O S K				humanPARP3
					murinePARP
					Majority
	550	560	570	580	590
541	H S A H V L E K G G K V F S A T L G L V D I V K G T N S Y Y K L Q L L E D D K E N R Y W I F R S W O R V G T V I G S N K				600
100	- - - D V Y D V M L N Q T N L O P N N K Y V L I Q L L E D D A O R N F S V W H R W O R V G K M - G O H S				humanPARP1
73	- - - Y N C T L N O T N I E N N N N K F Y I I O L L E D D S N - R P F T C W N R W O R V G E - V G Q S K				humanPARP2
60	- - - Y D C T L N O T N I G N N N N K F Y I I O L L E E Q S - R P F - C W N R H G R V G E - V G Q S K				murinePARP

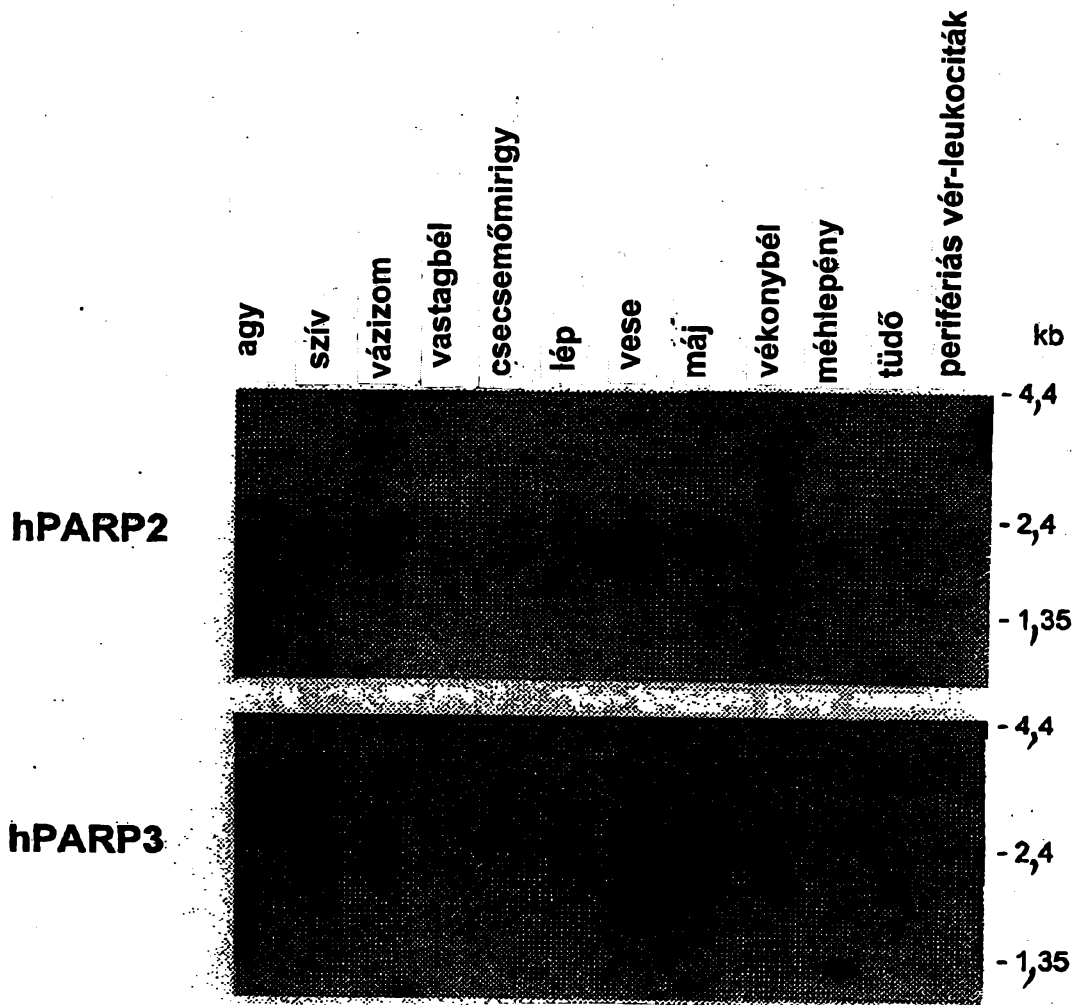
1(2). ábra



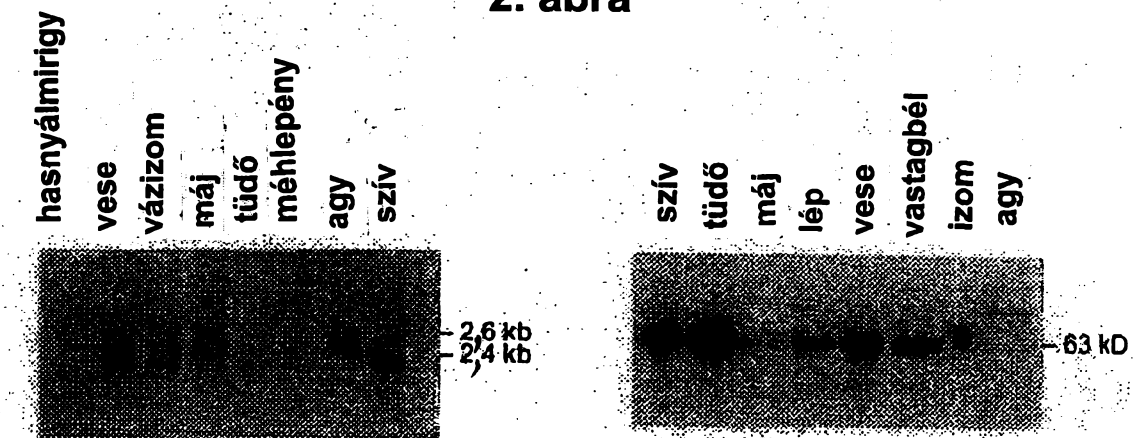
1(3). ábra

878	RIA P H E A P - S G G R V G K G I Y P A S E N S K S A G Y V X T S X C G G H X X V O L N L L G B V A L G X E H E L X X A	910	920	930	940	950	960	Majority
431	RIA P P E A P V T G Y H F G K G I Y P A D M V S K S A N Y C H T S Q - - G D P I G L I L L G E V A L G N M Y E L K H A							humanPARP1
407	RIA P P E A P I T G Y M F G K G I Y P A D M S S K S A N Y C P A S R - - L K N T G L L L L S E V A L G Q C N E L L E A							humanPARP2
400	RI M P H - - - S G G R V G K G I Y P A S E N S K S A G Y V I G N K X C G A H H V G Y M P L G B V A L G Q R E H I N T D							humanPARP3
	RI N P H - - - S G G R V G K G I Y P A S E N S K S A G Y V T H H C O G H Q V G Y N P L G E V A L G Q K E H I T I D							murinePARP
	N P S L K S L P P G K D S V I G L G K T E P D P A Q D I E L E L D G Q Q V V P L G P P V X C Q X F X S S X F S L - Y S	970	980	990	1000	1010	1020	Majority
936	S H I S K - L P K G K H S V X G L G K T T P P P S A N I S L D - - - G V D V P L G T Q I S S Q V - - - N D T S L L Y N							humanPARP1
489	N P K A E G L L Q G K H S T K Q L G K M A P P S A H P V T L N - - - G S T V P L G P A S D T G I L N P D G Y T L N Y N							humanPARP2
463	N P S L K S P P P G P D S V I A R G H T E P D P T Q D T E L E L D C O O V V V P O G Q P P V C P E P S S T P S Q - - - S							humanPARP3
456	D P S L K S P P P G P D S V I A R G Q T E P D P A Q D I E L E L D C O O P V V P O G P P V Q C P S F K S S P S Q - - - S							murinePARP
	E Y L V Y X E S Q V R L R Y L L E V H F M P - X X L W -	1030	1040					Majority
988	E Y I V Y D I A Q V N L K Y L L K L K P N F X T S L W .							humanPARP1
545	E Y I V Y N P N Q V R H R Y L L K V Q I P N F - C O L W .							humanPARP2
521	E Y L I Y O E S Q C R L R Y L L E V H L .							humanPARP3
514	E Y L I Y K E S Q C R L R Y L L E I H - - - - - L							murinePARP

1(4). ábra



2. ábra

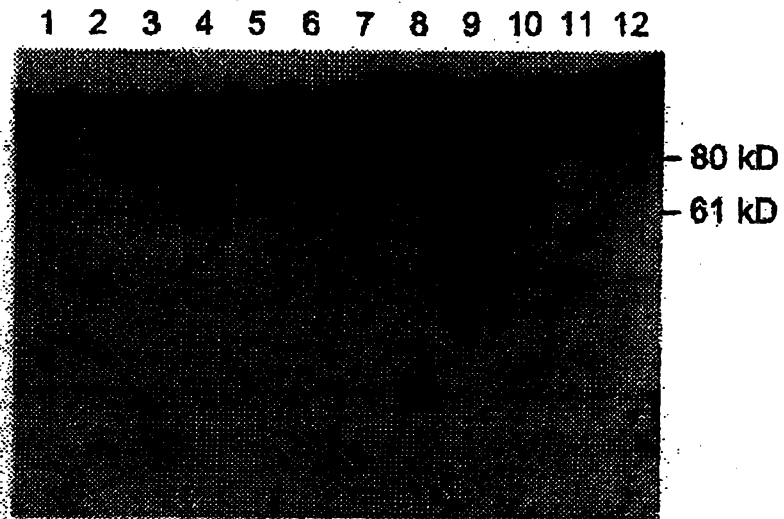


Northern Blot analízis  
Humán PARP3 szöveti megoszlása

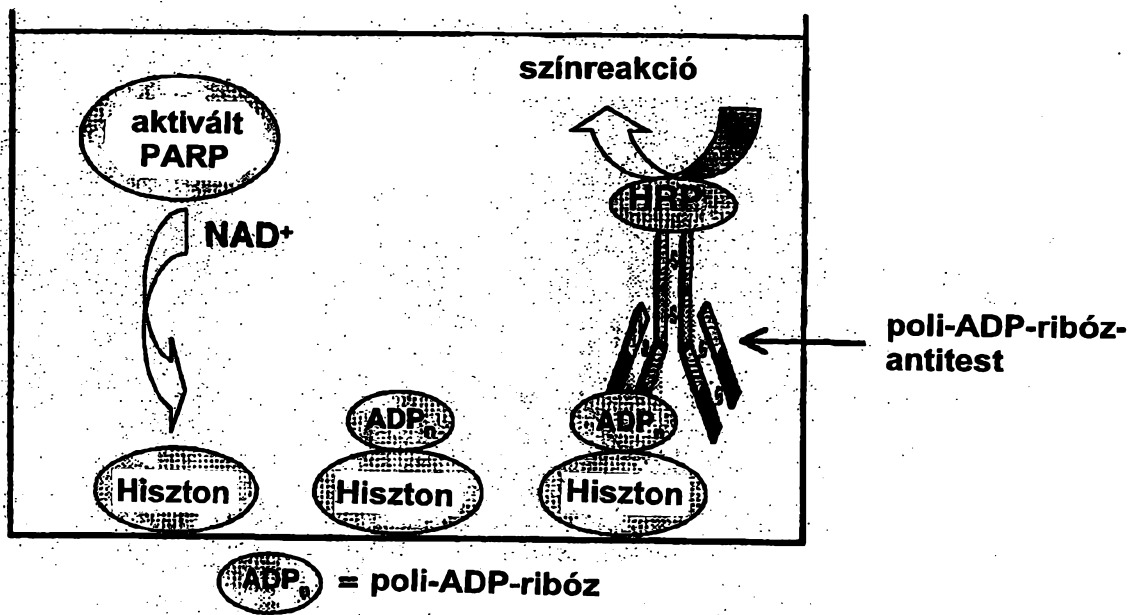
Western Blot analízis  
PARP3 szöveti megoszlása

3. ábra

4. ábra

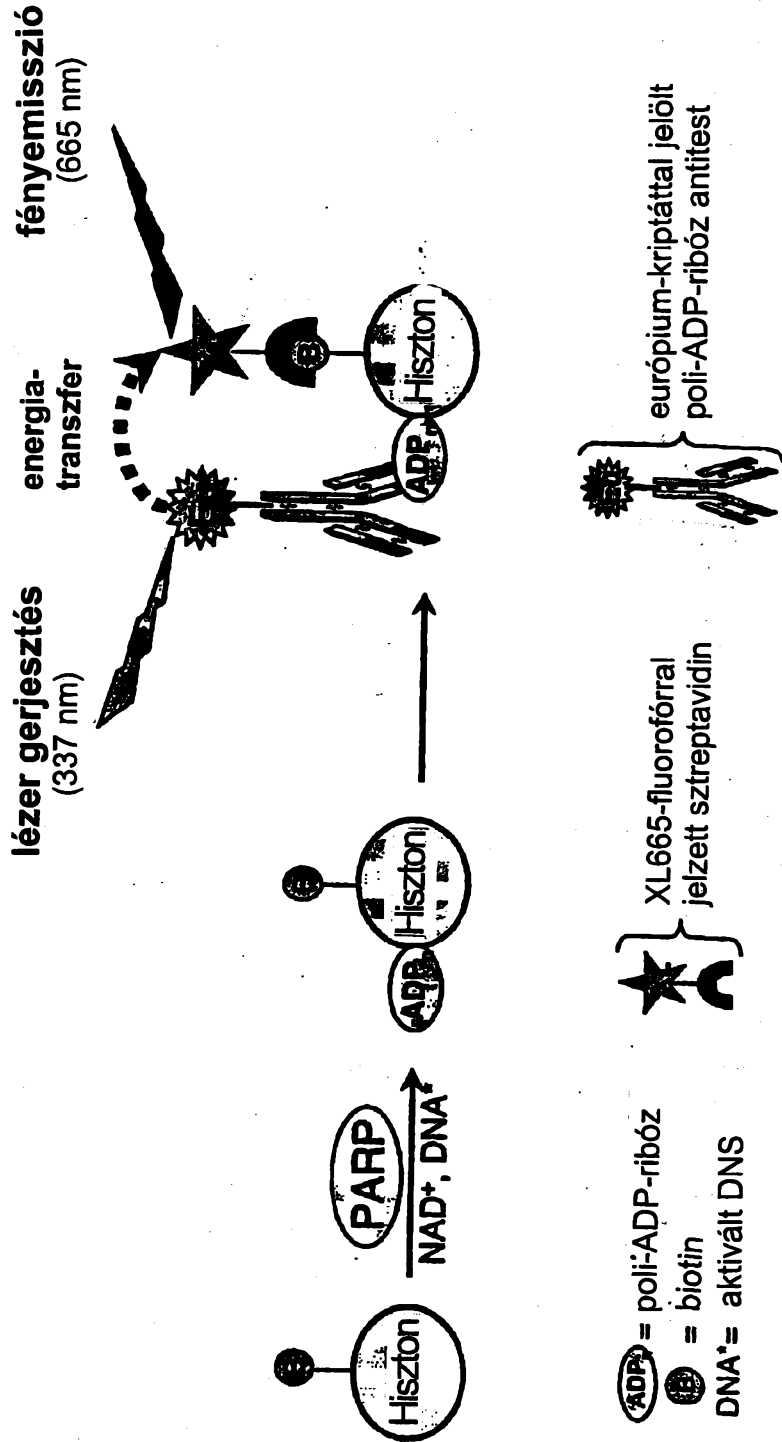


5. ábra



HRP = torma peroxidáz

6. ábra



7. ábra