

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99807043.2

C12N 9/10
C12N 15/54 C07K 14/455
C12N 15/10 C12Q 1/68
G01N 33/53 A61K 48/00
A01K 67/027 A61K 31/70
A61K 38/45

[43]公开日 2001 年 7 月 18 日

[11]公开号 CN 1304446A

[22]申请日 1999.6.4 [21]申请号 99807043.2
[30]优先权
[32]1998.6.5 [33]DE [31]19825213.7
[32]1999.3.1 [33]DE [31]19908837.3
[86]国际申请 PCT/EP99/03889 1999.6.4
[87]国际公布 WO99/64572 德 1999.12.16
[85]进入国家阶段日期 2000.12.5
[71]申请人 BASF 公司
地址 德国路德维希港
[72]发明人 M·科克 T·赫格尔 B·克雷格尔
B·奥特尔巴赫 W·卢比施
H·-G·勒麦雷

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 王其灏

权利要求书 5 页 说明书 84 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 聚(ADP-核糖)聚合酶基因
[57]摘要

本发明涉及一种聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)同系物,其具以下的氨基酸序列,a)功能性 NAD⁺结合结构域及 b)不含下式锌指序列 基序 CX₂CX_mHX₂C 其中, m 为自 28 或 30 的整数,及 X 基各自独立为任何氨基酸;及其功能性相当物。本发明还涉及编码该聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)同系物的核酸,该新蛋白质的特异性抗体,含有本发明产品的药剂或基因治疗剂,测定本发明的蛋白和核酸的方法,本发明蛋白的结合配偶体的效应物的方法,新 PARP 效应物及测定该效应物效能的方法。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)同系物, 其具以下的氨基酸序列

a) 功能性 NAD^+ 结合结构域

及

b) 不含下式锌指序列基序



其中

m 为自 28 或 30 的整数值, 及 X 基各自独立为任何氨基酸;

10 及其功能性相当物。

2. 如权利要求第 1 项的 PARP 同系物, 其中功能性 NAD^+ 结合结构域包括以下一般序列基序之一:

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

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

15 $\text{LLWHG}(\text{S/T})\text{X}_7\text{IL}(\text{S/T})\text{XGLR}(\text{I/V})\text{XPX}_n(\text{S/T})\text{GX}_3\text{GKGIYFAX}_3\text{SKSAX}$
Y

其中

n 为自 1 至 5 的整数值, 及 X 基各自独立为任何氨基酸。

3. 如权利要求第 1 或 2 项的 PARP 同系物, 至少包括另一以下
20 部分序列基序:

$\text{LX}_9\text{NX}_2\text{YX}_2\text{QLLX}(\text{D/E})\text{X}_{10/11}\text{WGRVG}$,

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

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

$\text{FYTIXIPHXXFGX}_3\text{PP}$; 及

25 $\text{KX}_3\text{LX}_2\text{LXDIEXAX}_2\text{L}$,

其中 X 基各自独立为任何氨基酸。

4. 如上述权利要求之一的 PARP 同系物, 选自人 PARP 同系物, 其具在 SEQ ID NO: 2(人 PARP2)或 SEQ ID NO: 4 或 6(人 PARP3 第 1 或 2 型)中所示的氨基酸序列; 或鼠 PARP 同系物, 其具在 SEQ
30 ID NO: 8(小鼠 PARP 长型)或 SEQ ID NO: 10(小鼠 PARP 截短型)中所示的氨基酸序列; 及其功能性相当物。

5. 一种如上述权利要求之一的 PARP 同系物的结合配偶体，选自

- a) 其抗体及片段，
- b) 蛋白质样化合物，其与蛋白质的部分序列相互作用，及
- 5 c) 低分子量效应物，其调节催化 PARP 活性或 PARP 分子的另一种生物功能。

6. 一种核酸，包括

- a) 一种核苷酸序列，编码至少一种如权利要求第 1 至 4 项中任一项的同系物，或其互补的核苷酸序列；
- 10 b) 一种核苷酸序列，其与在 a) 中特定的序列在严格条件下杂交；或
- c) 从在 a) 和 b) 中界定的核苷酸序列，由遗传密码的简并性而衍生的核苷酸序列。

7. 如权利要求第 6 项的核酸，包括

- 15 a) 在 SEQ ID NO: 1 中所示的核苷酸 + 3 至 + 1715；
- b) 在 SEQ ID NO: 3 中所示的核苷酸 + 242 至 + 1843；
- c) 在 SEQ ID NO: 5 中所示的核苷酸 + 221 至 + 1843；
- d) 在 SEQ ID NO: 7 中所示的核苷酸 + 112 至 + 1710；或
- e) 在 SEQ ID NO: 9 中所示的核苷酸 + 1 至 + 1584。

20 8. 一种表达盒，包括在至少一种调节核苷酸序列的基因控制下，至少一种如权利要求第 6 或 7 项中任一项的核苷酸序列。

9. 一种重组载体，包括至少一种如权利要求第 8 项的表达盒。

10. 一种重组微生物，包括至少一种如权利要求第 9 项的重组载体。

25 11. 一种导入外来基因的哺乳动物，包括如权利要求第 9 项的载体。

12. 一种 PARP - 缺乏的哺乳动物或 PARP - 缺乏的真核生物细胞，其中功能性表达至少一种编码如权利要求第 1 或 2 项中任一项的 PARP 同系物的基因被抑制。

30 13. 一种 PARP 抑制剂的体外检测方法，其包括

- a) 将未与支持物结合的或与支持物结合的聚 ADP - 可核糖苷

化靶物与反应混合液培养，其混合液包括

a1) 如权利要求第 1 至 4 项中任一项的 PARP 同系物，

a2) PARP 活化剂；及

a3) PARP 抑制剂或其中至少一个被怀疑为 PARP 抑制剂的
5 析物；

b) 进行聚 ADP 核糖苷化反应；及

c) 定量或定性地测定靶物的聚 ADP 核糖苷化。

14. 如权利要求第 13 项的方法，其中 PARP 同系物系与 PARP
活化剂和 PARP 抑制或其中被怀疑具有至少一个 PARP 抑制剂的分析
10 物，在聚 ADP 核糖苷化反应进行前预培养。

15. 如权利要求第 13 或 14 项中任一项的方法，其中聚 ADP-核
糖苷化靶物是组蛋白蛋白质。

16. 如权利要求第 13 至 15 项中任一项的方法，其中 PARP 活化
剂为活化 DNA。

17. 如权利要求第 13 至 16 项中任一项的方法，其中聚 ADP 核糖
15 苷化反应系由添加 NAD^+ 开始。

18. 如权利要求第 13 至 17 项中任一项的方法，其中与支持物结
合的靶物的聚 ADP 核糖苷化系使用抗聚 (ADP-核糖) 抗体测定。

19. 如权利要求第 13 至 17 项中任一项的方法，其中未与支持物
20 结合的靶物系以受体荧光团标记。

20. 如权利要求第 19 项的方法，其中未与支持物结合的抗体的聚
ADP 核糖苷化系使用抗聚 (ADP-核糖) 抗体测定，其以能将能量转
予受体荧光团的供体荧光团标记。

21. 如权利要求第 19 和 20 项中任一项的方法，其中靶物为生物
25 素化的组蛋白，及受体荧光团经抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白偶
合至其上。

22. 如权利要求第 20 或 21 项中任一项的方法，其中抗聚 (ADP
-核糖) 抗体载有氨基酸辅作为供体荧光团。

23. 一种体外筛选 PARP 分子的结合配偶体的方法，其包括

30 a1) 将至少一种如权利要求第 1 至 4 项中任一项的 PARP 同系物
固定在支持物上；

b1) 将固定化 PARP 同系物与被怀疑其中具有至少一种结合配偶体的分析物接触; 及

c1) 在适当时在一段培养时间后, 测定与固定化 PARP 同系物结合的分析物成分;

5 或

a2) 将包括至少一个 PARP 分子的可能结合配偶体的分析物固定
在支持物上;

b2) 将固定化分析物与至少一个在其中找寻结合配偶体的如权利
要求第 1 至 4 项中任一项的 PARP 同系物接触; 及

10 c2) 在适当时在一段培养时间后, 检视固定化分析物的 PARP 同
系物结合。

24. 一种定性或定量地测定核酸的方法, 其核酸编码如权利要求
第 1 至 4 项中任一项的 PARP 同系物, 其包括

15 a) 将生物样品与如权利要求第 6 和 7 项中任一项的一定量外源核
酸培养, 在严格条件下杂交, 测定杂交核酸及, 在适当时与标
准物比较; 或

b) 将生物样品与一对对 PARP 同系物编码的核酸具特异性的寡
核苷酸引物培养, 扩增核酸, 测定扩增产物, 及在适当时, 与
标准物比较。

20 25. 一种定性或定量地测定如权利要求第 1 至 4 项中任一项的
PARP 同系物的方法, 其包括

a) 将生物样品与对 PARP 同系物特异的结合配偶体培养,

b) 检测结合配偶体/PARP 复合物, 及在适当时,

c) 比较结果与标准物。

25 26. 如权利要求第 25 项的方法, 其中结合配偶体为抗体或其结合
片段, 其在适当时载有可检测的标记。

27. 一种如权利要求第 24 至 26 项中任一项以诊断能量不足介导
疾病的方法。

28. 一种测定 PARP 效应物效力的方法, 其包括

30 a) 将如权利要求第 1 至 4 项中任一项的 PARP 同系物与包括生
理或病理 PARP 活性的效应物的分析物培养; 再在适当时除

去效应物；及

b) 在适当时在添加底物或共底物后，测定 PARP 同系物的活性。

29. 一种基因疗法组合物，其包括在基因疗法可接受载体中一种核酸构建物，其编码

5 a) 包括如权利要求第 6 和 7 项中任一项的编码核酸的反义核酸；
或

b) 对如权利要求第 6 和 7 项中任一项的核酸的核糖酶；或

c) 特定的 PARP 抑制剂。

10 30. 一种医药组合物，在医药上可接受的载体中，包括至少一种如权利要求第 1 至 4 项中任一项的 PARP 蛋白质，至少一种如权利要求第 5 项的 PARP 结合配偶体及至少一种如权利要求第 6 或 7 项的编码核苷酸序列。

15 31. 如权利要求第 5 项的低分子量 PARP 结合配偶体，用于诊断或治疗在发展和/或进展其中涉及至少一种 PARP 蛋白质或自其衍生多肽的病理状态。

32. 如权利要求第 5 项的低分子量 PARP 结合配偶体，用于诊断或治疗由能量不足介导的病理状态。

说明书

聚(ADP-核糖)聚合酶基因

5 本发明系有关新颖聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)基因及其衍生的蛋白质;对新颖蛋白质具特异性的抗体;医药及基因疗法组合物,其包括根据本发明的产物;分析测定根据本发明的蛋白质和核酸的方法;鉴定根据本发明蛋白质的效应物或结合配偶体的方法;测定如此效应物活性的方法及其用以诊断或治疗病理状态的用途。

10 在1966年,Chambon和同僚发现116 kD酶,在其后年间经详细表征现称为PARP(EC 2.4.2.30)(聚(腺苷-5'-二磷酸核糖)聚合酶)、PARS(聚(腺苷-5'-二磷酸核糖)合成酶)或ADPRT(腺苷-5'-二磷酸核糖转移酶)。在植物界(拟南芥(*Arabidopsis thaliana*))中,在1995年发现72 kD(637个氨基酸)PARP(Lepiniec L.等人,FEBS Lett 1995;364(2):103-8)。未清楚的是此截短形式的PARP是否为植物特异的个体还是加工品(“剪接”变异体或类似物)。116 kD PARP 7酶目前已知仅在动物和人体中有活性,其经描述于下,以下称为PARP 1以避免混淆。

20 PARP 1的主要生理功能似乎为其参预复合物修复机制,其细胞经发展以修复DNA链断裂处。对DNA链断裂处的主要细胞反应,再者,似乎包括聚(ADP-核糖)自NAD⁺的PARP 1-催化合成(参阅De Murcia, G.等人(1994)TIBS, 19, 172)。

25 PARP 1具基准的分子结构。3个主要功能元件目前已经鉴定: N-端46 kD DNA结合结构域;中央22 kD自身修饰结构域,其上连接着聚(ADP-核糖),而PARP 1酶活性随增加的延长而降低;及C-端54 kD NAD⁺结合结构域。亮氨酸拉链区经发现在自修饰结构域内,表明可能的蛋白质-蛋白质相互作用仅于果蝇的PARP中。所有目前已知的PARP假定以同源二聚体为活性形式。

30 分子的高度组织反映于氨基酸序列的强保守性。因此,氨基酸的62%保守已发现在人、小鼠、牛和鸡的PARP 1中。与果蝇的PARP有更大的结构差异。个别的结构域具有更为保守的簇串。因此,DNA结合区域含2个所谓锌指为次结构域(包括CX₂CX_{28/30}HX₂C型的基序),

其涉及 DNA 单链断裂处或单链 DNA 突出的 Zn^{2+} - 依赖性识别(例如在染色体末端上,端粒)。C-端催化的结构域包括约 50 个氨基酸模块(残基 859-908),其在脊椎动物间为约 100% 保守的(PARP “签名 (Signature)”)。此模块结合天然底物 NAD^+ 及因此管理聚(ADP-核糖)的合成(参阅 de Murcia, 上引)。GX₃GKG 基序特别地在此块中为 PARP 的特征。

上述的有利功能对应于多种疾病的病理(中风、心肌梗塞、败血症等)。PARP 涉及脑(Choi, D. W., (1997) 天然医学, 3, 10, 1073)、心肌(Zingarelli, B. 等人(1997), 心血管研究, 36, 205)及眼(Lam, T. T. (1997), 分子病理和药理学研究通讯, 95, 3, 241)的局部缺血造成的细胞死亡。由炎性介体诱导的 PARP 活化曾见于脓毒性休克(Szabo, C. 等人(1997), 临床探讨会刊, 100, 3, 723)。在这些病例中, PARP 的活化伴随 NAD^+ 的广泛地消耗。因为 1 摩尔 NAD^+ 的合成消耗 4 摩尔 ATP, 细胞能量供给戏剧性地降低。结果为细胞死亡。

在前述专业文献中所述的 PARP 1 抑制剂为烟碱酰胺和 3-氨基苄酰胺。3,4-二氢-5-[4-(1-六氢吡啶基)丁氧基]-1(2H)-异喹啉酮系由 Takahashi, K. 等人(1997), 脑血流和代谢会刊 17, 1137, 所揭示。进一步抑制剂系述,例如于 Banasik, M. 等人(1992) J. Biol. Chem., 267, 3, 1569 及 Griffin, R. J. 等人(1995), 抗癌药物设计, 10, 507。

被描述为人 PARP 1 的高分子量结合配偶体包括碱基切除修复(BER)蛋白质 XRCC 1(X-光修复交叉互补 1), 其经锌指基序和 BRCT(BRCA 1 C-端)模块(氨基酸 372-524)结合(Masson, M. 等人(1998)分子和细胞生物学, 18, 6, 3563)。

基于 PARP 的多样生理和病理功能,本发明的目标是提供新颖 PARP 同系物。理由是均相 PARP 的提供对发展新颖药物靶物及新颖药物特别重要,以期改进涉及 PARP、PARP 同系物或自其衍生的物质的病理状态的诊断和/或疗法。

目标通过提供 PARP 同系物达到,优选地来自人和非人哺乳动物衍生,且具以下的氨基酸序列

a) 功能性 NAD^+ 结合结构域, 即具特征性 GX₃GKG 基序的 PARP “签

名”序列

及

b) 特别地在 N-端序列区域中, 即在最初 200 个 N-端氨基酸的区域中如, 例如在最初 100 个的区域中, 无下式的 PARP 锌指序列基序

5 CX₂CX_mHX₂C

其中

m 为自 28 或 30 的整数值, 及 X 基各自独立为任何氨基酸; 及其功能性相当物。

10 因为根据本发明的 PARP 分子特别代表功能性同系物, 其亦自然地具聚(ADP-核糖)合成活性。NAD 结合结构域必要地与此活性相对应且位于 C 端。

因此, 根据本发明的 PARP 必要特性系功能性 NAD⁺ 结合结构域 (PARP 签名) 的存在, 其位在氨基酸序列的 C-端区域 (即约在最后 400 个, 例如最后 350 或 300 个 C-端氨基酸的区域中), 结合着不具锌指基序的 N-端序列。因为在已知 PARP 中的锌指基序假定地贡献于 DNA 断裂的识别, 假定地根据本发明的蛋白质不与 DNA 相互作用或以另一种方式进行。有关的生化试验示范, 根据本发明的 PARP 2 可由“活化 DNA” (即由限制 DNase I 消化后的 DNA) 活化。可自此进一步结论根据本发明的 PARP 2 具 DNA 结合性质。然而, 根据本发明的 PARP DNA 结合与酶活化的机制和 PARP 1 不同。其 DNA 结合与酶活化, 如 20 述地, 由特性锌指基序所介导。无如此的基序存在于根据本发明的 PARP 中。假定地, 此些性质由根据本发明 PARP 的 N-端区域中的正电荷氨基酸所介导。因为“活化 DNA” (即例如在以去氧核酸酶 I 的限制处后的 DNA) 具很多缺点 (单链断裂、单链裂隙、单链突出、双链断裂等), 可能地虽然 PARP 1 和根据本发明的 PARP 系由相同“活化 DNA” 25 所活化, 其系由不同的缺点亚群 (例如单链裂隙而非单链断裂) 所活化。

功能性 NAD⁺ 结合结构域 (即催化结构域) 结合聚-(ADP-核糖) 合成的底物。与已知 PARP 一致, 特别是具有序列基序 GX¹X²X³GKG 的那些, 其中 G 为甘氨酸, K 为赖氨酸, 及 X¹、X² 和 X³ 各自独立为任 30 何氨基酸。然而, 惊人地, 如由比较根据本发明 PARP 分子的 NAD⁺ 结合结构域的氨基酸序列与前面揭示的人 PARP 1 者所示, 根据本发明的

序列与 NAD⁺ 结合结构域的已知序列明显地不同。

根据本发明的优选 PARP 分子优选地在普通的催化结构域上具以下的一般序列基序：

PX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (SEQ ID NO: 11), 特别地

5 (S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFA (SEQ ID NO: 12),
优选地

LLWHG(S/T)X₇IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFAX₃SKSAXY
(SEQ ID NO: 13)

10 其中 (S/T) 描述此序列位置由 S 或 T 的可替代占有, (I/V) 描述此序列位置由 I 或 V 的可替代占有及 n 为自 1 至 5 的整数值, 及 X 基各自独立为任何氨基酸。最后的组合亦称为“PARP 签名”组合。

自修饰结构域优选地同样存在于根据本发明的 PARP 中。其可位在例如在 NAD⁺ 结合结构域 N-端前面的自约 100 至 200 个氨基酸的区域中。

15 根据本发明的 PARP 同系物可附加地包括 N-端 NAD⁺ 结合结构域 (即约 30 至约 80 个氨基酸更近于 N 端)、下式的亮氨酸拉链样序列基序

(L/V)X₆LX₆LX₆L (SEQ ID NO: 14)

其中

20 (L/V) 代表此序列位置由 L 或 V 的可替代占有, 及 X 基各自独立为任何氨基酸。根据本发明所见的亮氨酸拉链基序明显地不同于自那些所述为果蝇 PARP 的位置。亮氨酸拉链可导致同质二聚体 (2 个 PARP 分子) 或异源二聚体 (1 个 PARP 分子及与其不同的结合配偶体)。

25 根据本发明的 PARP 同系物优选地, 附加地包括在 N-端上的上述亮氨酸拉链似序列基序, 即约 10 至 250 个氨基酸残基更近于 N 端, 至少另一个以下的部分序列基序:

LX₉NX₂YX₂OLLX(D/E)X_bWGRVG, (基序 1; SEQ ID NO: 15)

AX₃FXKX₄KTXNXWX₅FX₃PXK, (基序 2; SEQ ID NO: 16)

QXL(I/L)X₂IX₉MX₁₀PLGKLX₃QIX₆L, (基序 3; SEQ ID NO: 17)

30 FYTXIPHXFGX₃PP, (基序 4; SEQ ID NO: 18)

及

KX₃LX₂LXDIEXAX₂L

(基序 5; SEQ ID NO: 19)

其中 (D/E) 描述此序列位置由 D 或 E 可替代地占有, (I/L) 描述此序列位置由 I 或 L 可替代地占有, b 为整数值 10 或 11, 及 X 基各自独立为任何氨基酸。最优选地, 此些基序 1 至 5 全部存在于所述的序列中, 而基序 1 最近于 N 端。

上述的 PARP 签名基序在根据本发明的蛋白质中跟随着至少另一个以下的基序:

GX₃LXEVALG

(基序 6; SEQ ID NO: 20)

GX₂SX₄GX₃PX_aLXGX₂V

(基序 7; SEQ ID NO: 21) 及

E(Y/E)X₂YX₃QX₄YLL

(基序 8; SEQ ID NO: 22)

其中 (Y/F) 描述此序列位置由 Y 或 F 的可替代占有, a 等于 7 至 9 及 X 在各例中为任何氨基酸。最优选地此 3 个 C-端基序全部存在且在所述的序列中, 而基序 8 最近于 C 端。

根据本发明的优选 PARP 结构可图式地描述如下:

基序 1 至 5/PARP 签名/基序 6 至 8 或

基序 1 至 5/亮氨酸拉链/PARP 签名/基序 6 至 8

可能地, 进一步氨基酸残基, 例如多至 40 个排列在个别基序间及进一步氨基酸残基, 例如多至 80 个排列在 N 端上和/或在 C 端上。

根据本发明特别佳的 PARP 同系物为蛋白质人 PARP 2、人 PARP 3、小鼠 PARP 3 及其功能性相当物。称为 PARP 2 的蛋白质包括 570 个氨基酸 (参阅 SEQ ID NO: 2)。称为人 PARP 3 的蛋白质可能地以 2 种形式存在。第 1 型包括 533 个氨基酸 (SEQ ID NO: 4) 及第 2 型包括 540 个氨基酸 (SEQ ID NO: 6)。不同形式可能源自不同起始的转译。称为小鼠 PARP 3 的蛋白质以 2 种形式存在, 其不同在于 5 个氨基酸 (15 bp) 的删除。第 1 型包括 533 个氨基酸 (SEQ ID NO: 8) 及第 2 型包括 528 个氨基酸 (SEQ ID NO: 10)。本发明的 PARP 同系物在序列中显著不同于拟南芥的该 PARP 蛋白质 (见以上)。例如, PARP 2 和 PARP 3 不包括植物 PARP 特异肽序列 AAVLDQWIPD, 相对应于拟南芥蛋白质的氨基酸残基 143 至 152。

本发明进一步涉及根据本发明 PARP 同系物的结合配偶体。此些结合配偶体优选地选自

- a) 抗体及其片段, 例如 Fv、Fab、F(ab')₂,
- b) 蛋白质性质的化合物, 其例如经以上的亮氨酸拉链区域或另一个序列段, 与 PARP 相互作用, 及
- c) 低分子量效应物, 其调节生物 PARP 功能, 例如催化性 PARP 活性,

5 即消耗 NAD⁺ 的 ADP 核糖苷化, 或与活化剂蛋白质或与 DNA 结合。

本发明进一步有关核酸, 包括

- a) 编码至少一个根据本发明的 PARP 同系物的核苷酸序列, 或其互补的核苷酸序列;
- b) 与如在 a) 中所特异的序列杂交的核苷酸序列, 优选地在严紧条件下; 或
- c) 由于基因码简并性而由 a) 和 b) 中界定的核苷酸序列衍生的核苷酸序列。

10

根据本发明的合适核酸特别地包括至少一个部份序列, 其编码上述氨基酸序列基序。

15 根据本发明的优选核酸包括如示于 SEQ ID NO: 1 和 3 中的核苷酸序列, 及特别地具有根据本发明 PARP 同系物的特性的部份序列, 如包括以下的核苷酸序列

- a) 示于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 + 3 至 + 1715;
- b) 示于 SEQ ID NO: 3 的核苷酸 + 242 至 + 1843;
- c) 示于 SEQ ID NO: 5 的核苷酸 + 221 至 + 1843;
- d) 示于 SEQ ID NO: 7 的核苷酸 + 112 至 + 1710; 或
- e) 示于 SEQ ID NO: 9 的核苷酸 + 1 至 + 1584

20

或 a)、b)、c)、d) 和 e) 的部份序列, 其编码根据本发明 PARP 同系物的上述特性氨基酸序列基序。

25 本发明进一步有关表达盒, 其包括在调节核苷酸序列的基因控制下至少一种根据本发明的上述核苷酸序列。此些可用以制备根据本发明的重组载体, 例如病毒载体或质粒, 其包括至少一个根据本发明的表达盒。

根据本发明的重组微生物以至少一种上述载体转化。

30 本发明亦有关以根据本发明的载体转染 (transfigiert) 外来基因哺乳动物。

本发明进一步有关体外检测方法，其检测 PARP 抑制剂，均相或多相地进行，其包括

a) 将无支持物的或有支持物的可聚 - ADP - 核糖苷化靶物与包括以下的反应混合液温孵

5 a1) 根据本发明的 PARP 同系物;

a2) PARP 活化剂; 及

a3) PARP 抑制剂或分析物，其中至少被怀疑为一个 PARP 抑制剂;

b) 进行聚 ADP 核糖苷化反应; 及

c) 定性或定量地测定靶物的聚 ADP 核糖苷化。

10 检测方法优选地由将 PARP 同系物与 PARP 活化剂和 PARP 抑制剂或至少一个被怀疑为抑制剂的的分析物预培养，在进行聚 ADP 核糖苷化反应前，进行约 1 - 30 分。

在由具单链断裂的 DNA (称为根据本发明的“活化 DNA”) 活化后，PARP 在 NAD 存在下聚 - ADP 核糖苷化大量的核蛋白质。此些蛋
15 白质，包括 PARP 自身，及组蛋白等。

在检测方法中所用的优选可聚 - ADP - 核糖苷化靶物为以其天然形式的组蛋白蛋白质或自其衍生的可聚 - ADP - 核糖苷化相当物。由 Sigma 供应的组蛋白制备物 (SIGMA, 目录号 H - 7755; 自小牛胸腺的组蛋白 II - AS 型, Luck, J. M. 等人, J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958),
20 Satake K. 等人, J. Biol. Chem., 235, 2801 (1960)) 经使用为实例。原则上可能地使用易于 PARP 聚 - ADP - 核糖苷化的所有类型蛋白质或其部分。此些优选地为核蛋白质，例如组蛋白、DNA 聚合酶、端粒酶或 PARP 自身。自相对应蛋白质衍生的合成肽亦可作为靶物。

在根据本发明的 ELISA 中，可能地使用在自约 0.1 微克/孔至约 100
25 微克/孔的范围内的组蛋白量，优选地约 1 微克/孔至约 10 微克/孔。PARP 酶的量在自约 0.2 皮摩尔/孔至约 2 纳摩尔/孔的范围内，优选地自约 2 皮摩尔/孔至约 200 皮摩尔/孔，反应混合液在各例中包括 100 微升/孔。降至更小孔则相应更少的反应量。

在根据本发明的 HTRF 分析法中，采用相同量的 PARP，及组蛋白
30 或修饰组蛋白的量在自约 2 纳克/孔至约 25 微克/孔的范围内，优选地约 25 纳克/孔至约 2.5 微克/孔，反应混合液在各例中包括 50 微升/孔。降至

更小则相应反应量更少。

根据本发明所用的 PARP 活化剂优选地为活化 DNA。

不同类型的受损 DNA 可作用为活化剂。DNA 损伤可由去氧核酸酶或其他 DNA 修饰酶（例如限制内核酸酶）消化，由照射或其他物理方法或化学处理 DNA 产生。进一步可能地以靶物方式使用合成寡核苷酸刺激 DNA 损伤情况。在藉实例所示的分析法中，自小牛胸腺的活化 DNA 已被采用（Sigma，产物号 D4522；CAS：91080-16-9，由 Aposhian 和 Kornberg 的方法使用小牛胸腺 DNA（SIGMA D-1501）和去氧核糖核酸酶第 I 型（D-4263）制备。Aposhian, H. V. 和 Kornberg, A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)）。活化 DNA 在反应步骤中在自 0.1 至 1000 微克/毫升的浓度范围下使用，优选地自 1 至 100 微克/毫升。

聚 ADP 核糖苷化反应在根据本发明的方法中由添加 NAD^+ 启动。NAD 浓度在自约 0.1 微摩尔浓度至约 10 毫摩尔浓度的范围内，优选地在自约 10 微摩尔浓度至约 1 毫摩尔浓度的范围内。

在可多相地进行以上方法的变通方案中，结合支持物的靶物的聚 ADP 核糖苷化系使用抗聚（ADP-核糖）抗体测定。为达成此，反应混合液系与结合支持物的靶物分开，清洗及与抗体培养。此抗体本身可经标记。然而，作为检测结合抗聚（ADP-核糖）抗体的可替代法，标记的第二抗体或相对应的标记抗体断可予应用。合适的标记物为例如放射标记、发色团-或荧光团-标记生物素化、化学发光标记、具顺磁金属的标记，或特别地例如以辣根过氧化酶的酶标记。适当检测技术通常对熟谙此技艺者系已知的。

在可均相地进行以上方法的变异法中，无支持物的靶物以受体荧光团标记。在此例中所用的优选靶物为生物素化组蛋白，受体荧光团经抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白与组蛋白的生物素基团偶合。特别合适作为受体荧光团的为藻胆蛋白质（例如藻蓝蛋白、藻红蛋白），例如 R-藻蓝蛋白（R-PC）、别藻蓝素（APC）、R-藻红蛋白（R-PE）、C-藻蓝蛋白（C-PC）、B-藻红蛋白（B-PE）或其互相或与荧光染料如 Cy5、Cy7 或德州红（Tandem 系统）的组合（Thammapalerd, N. 等人，东南亚热带医学和公共健康会刊，27 (2): 297-303 (1996)；Kronick, M. N. 等人，临床化学，29 (9), 1582-1586 (1986)；Hicks, J. M., 人

体病理学, 15 (2), 112 - 116 (1984))。在实施例中所用的染料 XL 665 为交联的别藻蓝素 (Glazer, A. N., Rev. Microbiol., 36, 173 - 198

(1982) ; Kronick, M. N., J. Imm. Meth., 92, 1 - 13 (1986) ; MacColl, R. 等人, 藻胆蛋白质, CRC Press Inc., Boca Raron, Florida (1987) ;

5 MacColl, R. at al, Arch. Biochem. Biophys., 208 (1) 42 - 48 (1981))。

此外, 在均相方法中优选的在测定未结合支持物的靶物的聚 ADP 核糖苷化, 使用抗聚 (ADP - 核糖) 抗体, 其系以供体荧光团标记, 其在因标记抗体与聚 ADP - 核糖苷化组蛋白结合而供体和受体在空间上接近时, 能转移能量于受体荧光团。氨基酸铕优选地作为抗聚 (ADP - 核糖) 抗体的供体荧光团。

除使用氨基酸铕外, 其他化合物亦可能作为潜在供体分子。在一方面, 此会留下氨基酸盐笼 (kryptatkafig) 的修饰。由其他稀土金属如铽置换铕亦为可能的。决定性地, 荧光持续时间越长时间迟滞越长 (Lopez, E. 等人, Clin. Chem. 39/2, 196 - 201 (1993) ; 美国专利号 5, 534, 622) 。

15 上述的检测方法系基于以下原理, 即 PARP 活性与在组蛋白上形成 ADP - 核糖聚合物量间有相关性。在此所述的分析法, 以 ELISA 和 HTRF (均相时间解析 (time - resolved) 荧光) 形式, 使用特定抗体可能定量分析 ADP - 核糖聚合物。此两种分析法的特定具体实施例系详述于以下实施例中。

20 发展的 HTRF (均相时间解析荧光) 分析系统使用特定的抗体测定在组蛋白上聚 (ADP - 核糖) 的形成。相对于 ELISA, 此分析法在均质相中进行, 而无分开和清洗步骤。此造成更高的样品产量及更少的可能误差敏感性。HTRF 系基于在 2 种荧光团间 “荧光共振能量转移 (FRET)” 。在 FRET 分析法中, 激发的供体荧光团可当其在空间上相互接近时, 转移其能量予受体荧光团。在 HTRF 技术中, 供体荧光团为氨基酸铕 [(Eu)K] 及受体为 LX 665, 稳定化的别藻蓝素。氨基酸铕系基于 Jean Marie Lehn 的研究 (Strasbourg) (Lopez, E. 等人, Clin. Chem., 39/2, 196 - 201 (1993) ; 美国专利号 5, 534, 622) 。

30 在均相分析法中, 所有成份均于测定时出现。而此具进行分析法的优点 (快速、复合性), 必要时需排除分析成份的干扰 (原有的荧光、染剂的猝灭等)。HTRF 通过双波长 (665 纳米、620 纳米) 下的时间

延迟测定而排除如此干扰。HTRF 具极长的衰退时间，时间延迟测定因此是可能的。不受短生背景荧光（例如自分析成份或物质库的抑制剂）影响。此外，测定总在 2 个波长下进行，以期补足有色物质的猝灭作用。HTRF 分析法可例如在 96- 或 384- 孔微滴度板孔式下进行，及使用“发现 HTRF 微滴度板分析仪”（Canberra Packard）评估。

5 发现 HTRF 微滴度板分析仪”（Canberra Packard）评估。

根据本发明亦提供的是以下 PARP 结合配偶体，特别地根据本发明的 PARP 同系物的体外筛选方法。

第一个变异法由以下进行

- a1) 将至少一个 PARP 同系物固定在支持物上；
- 10 b1) 将固定化 APRP 同系物与其中被怀疑有至少一个结合配偶体的分析物接触；及
- c1) 在适当时在一段培养时段后，测定与固定化 PARP 同系物结合的分析物成分。

第二个变异法

- 15 a2) 将分析物固定在支持物上，其分析物包括至少一个 PARP 同系物的可能结合配偶体；
- b2) 将固定化分析物与至少一个结合配偶体所找寻的一个 PARP 同系物，接触
- c2) 在适当时在一段培养时段后，检视固定化分析物上 PARP 同系物的结合。
- 20

本发明亦有关定性或定量测定编码 PARP 同系物的核酸的方法，其包括

- a) 将生物样品与一定量根据本发明的外源核酸（例如与约 20 至 500 个碱基的长度或更长）培养、杂交、优选地在严格条件下，测定杂交的核酸及，在适当时与标准物比较；或
- 25 b) 将生物样品与一定量对编码 PARP 同系物核酸具特异性的寡核苷酸引物对培养，扩增核酸，测定扩增产物及，在适当时与标准物比较。

本发明进一步有关定性或定量测定根据本发明 PARP 同系物的方法，其包括

- 30 a) 将生物样品与至少一个 PARP 同系物特异性结合配偶体温解，
- b) 侦测结合配偶体/PARP 复合物及，在适当时

c) 将结果与标准物比较。

在此例中结合配偶体优选地抗 PARP 抗体或其结合片段，其在适当时载有可检测的标志。

5 根据本发明对 PARP，特别地对 PARP 同系物及对其编码核酸序列的测定方法系合适的及对诊断脓毒性或局部缺血性组织损伤，特别是中风、心肌梗塞、糖尿病或脓毒性休克系有利的。

本发明进一步包括测定 PARP 效应物效率的方法，其包括

- 10 a) 将根据本发明的 PARP 同系物与包括具生理或病理 PARP 活性的效应物的分析物培养，在适当时再除去效应物；及
b) 在适当时在添加底物或共底物后，测定 PARP 同系物的活性。

本发明进一步有关基因疗法组合物，其在基因疗法可接受的载体中包括核酸构建物，其编码

- 15 a) 包括根据本发明的编码核酸的反义核酸；或
b) 针对根据本发明非编码核酸的核糖酶；或
c) 特异 PARP 抑制剂。

本发明进一步有关医药组合物，在医药上可接受的载体中，包括至少一种根据本发明的 PARP 蛋白质，至少一种根据本发明的结合配偶体或至少一种根据本发明的编码核苷酸序列。

20 最后，本发明系有关在诊断或治疗在发展和/或进行的病理状态上 PARP 同系物的结合配偶体的用途，其中涉及至少一种 PARP 蛋白质，特别地根据本发明的 PARP 同系物，或自其衍生的多肽。使用的结合配偶体可例如为低分子量结合配偶体，其分子量可例如为少于约 2000 道尔顿或少于约 1000 道尔顿。

25 此外，本发明系有关诊断或治疗由能量不足介导病理状态的 PARP 结合配偶体的用途。为本发明目的的能量不足特别地为细胞能量不足，其经见于全身性或于个别身体区域、器官或器官区域，或组织或组织区域不适的病人。这些病症的特征在于，NAD 和/或 ATP 损耗超出了 NAD 和/或 ATP 量的生理变异范围（上限或下限），及优选地由具 PARP 活性的蛋白质，特别地根据本发明的 PARP 同系物，或自其衍生的多肽所
30 介导。

“能量不足介导的疾病”，为本发明的目的，附加地包括组织损伤

系来自因坏死或细胞凋亡所致的细胞死亡。根据本发明的方法系适合治疗和预防因细胞计划凋亡或坏死的细胞损伤所致的组织损伤；因局部缺血和/或再灌注对神经组织的损伤；神经疾病；神经退行性疾病；血管中风；治疗和预防心血管疾病；治疗其他疾病或病况如，老年性黄斑变性、
5 AIDS 或其他免疫缺陷疾病；关节炎；动脉粥样硬化症；恶病质；癌症；骨骼肌的退行性疾病；糖尿病；颅外伤；胃肠道的炎性疾病，例如 Crohnsche 氏症；肌肉营养不良；骨关节炎；骨质疏松症；慢性和/或急性疼痛；肾失调；视网膜局部缺血；脓毒性休克（例如内毒素休克）；皮肤老化或全身老化；老化的全身显现。根据本发明的方法可附加地予以采用，以延长身体组织细胞的寿命和增殖能力及，与照射疗法相组合，以敏感化肿瘤细胞。
10

本发明特别有关使用如上界定的 PARP 结合配偶体以诊断或治疗（急性或预防）由能量不足所介导的病理状态，及选自神经退行性疾病，或由脓毒性或局部缺血所致的组织损伤，特别地神经毒性紊乱、中
15 风、心肌梗塞、在梗塞解离（Infarktlyse）期间或其后的损伤（例如以 TPA、Reteplase 或机械性以激光或旋光束（Rotablator）引起）及在心瓣置换期间或其后的微梗塞，动脉瘤切除术和心脏移植、头和脊髓的重伤、肾梗塞（急性肾衰竭、急性肾无能或在肾移植和其后的损伤）、骨骼肌的损伤、肝梗塞（肝衰竭、在肝移植期间或其后的损伤）、外周神
20 经病痛、AIDS 痴呆、脓毒性休克、糖尿病、在局部缺血后发生的神经退化疾病、重伤（颅脑重伤）、大出血、蜘蛛膜下出血和中风，以有神经退化疾病如阿尔兹海默氏病、多梗塞痴呆、哈丁顿氏症、帕金森氏症、肌萎缩侧索硬化、癫痫，特别地全身性癫痫发作如癫痫小发作

（Petitmal）和紧张阵挛发作及部分癫痫发作如颞叶性，及复合的部分
25 发作、肾衰竭，亦于肿瘤的化学治疗和转移的预防及以治疗炎症和风湿性疾病，例如类风湿关节炎，进一步以治疗极窄冠状动脉和极窄外周动脉，例如腿动脉的脉管再形成。“局部缺血”，为本发明目的，包括氧的局部性不正常供应予组织，由动脉血流封闭所致。球状局部缺血在血流至整个脑经中断一段有限时间时发生。此可例如由心停止所致。病灶
30 局部缺血在脑的部分经切断其正常血供应时发生。病灶局部缺血可由血管的血栓性栓塞封闭，由脑重伤、水肿或脉肿瘤所致。甚至短暂的局部

缺血可导致广泛神经元损伤。虽然对“神经组织”的损伤可在局部缺血开始后数天或数周内发生，但一些永久性损伤（例如坏死性细胞死亡）在血供应中断后最初几分钟内发生。此损伤例如由谷氨酸的神经毒性所致及接着二次再灌注，例如自由基的释出（例如氧自由基、NO 自由基）。
 5 局部缺血可同样地在其他器官和组织中发生，例如在心（心肌梗塞及由冠状动脉的闭塞所致的其他心血管疾病）中或在眼睛（视网膜的局部缺血）中。

本发明附加地有关使用有效治疗量的 PARP 结合配偶体以影响神经元活性。“神经元活性”，为本发明目的，包括刺激损伤的神经元、
 10 促进神经元再生或治疗神经元疾病。“神经元损伤”，为本发明目的，包括各型对“神经组织”的损伤的及自此损伤所至的每一项物理或精神损伤或死亡。损伤的致因本质上为代谢、毒性、化学或热的及包括，藉实例，局部缺血、缺氧症、重伤、脑血管损伤、手术、压力、出血、照射、血管痉挛、神经变性疾病、感染、癫痫、知觉疾病、谷氨酸代谢混乱及因而所致的继发性。“神经组织”，为本发明目的，包括形成神经系统的不同成份，特别地由神经元、胶质细胞、星状细胞、施旺氏细胞、
 15 内部及供给用的血管系统、CNS、脑、脑干、脊髓、外周神经系统等组成。

“神经保护”，为本发明目的，包括神经元损伤的降低、断绝、减缓或改进，及暴露在神经元损伤下的神经组织的保护、恢复及再生。
 20

“神经变性疾病的预防”包括在人体中预防、减缓和改进神经变性疾病的可能性，其已诊断出如此疾病或其已包括在此些神经变性疾病的相应的风险人群中。已罹患此些疾病症状的患者亦可接受此种治疗。

“治疗”，为本发明目的，包括

- 25 (i) 在具如此倾向的人体中预防疾病、混乱或病状；
 (ii) 由减缓其发展预防疾病、混乱或病状；及
 (iii) 改进疾病、混乱或病状。

可由根据本发明的方法治疗的“神经学疾病”实例为神经痛（三叉神经、舌咽）、重症肌无力、肌肉营养不良、肌萎缩侧索硬化（ALS）、
 30 进展性肌肉萎缩性、由中毒所致的外周神经病痛（例如铅中毒）、孔巴二氏症候群、哈丁顿氏病、阿尔滋海默氏症、帕金森氏症或神经丛疾病。

根据本发明的方法优选地适于治疗神经学疾病，选自由物理损伤或生病所致的外周神经病痛；颅外伤，例如重创性脉损伤；脊髓的物理损伤；与脑损伤有关的中风，如与缺氧和脑损伤联合的中风，及脑再灌注损伤；脱髓鞘疾病（脊髓病、阿尔兹海默氏症、帕金森氏症、哈丁顿氏症、肌萎缩侧索硬化）。

根据本发明的方法可附加地用以治疗心血管疾病。“心血管疾病”，为本发明目的，包括那些导致局部缺血者或由局部缺血或心的局部缺血/再灌注所致者。实例为冠状血管疾病（例动脉粥样硬化症）、胸部绞痛、心肌硬塞、因心停止或分流手术的心血管损伤。

根据本发明的方法可用以治疗癌症或在照射疗法中以敏感化癌细胞。“癌症”一词经了解为广的观念。根据本发明蛋白质的调节剂可作为“抗癌剂”。例如，那些方法可用以治疗各型的癌症或肿瘤细胞，如 ACTH-生成肿瘤、急性淋巴或淋巴胚细胞白血病；急性或慢性淋巴细胞白血病；急性非淋巴细胞白血病；膀胱癌；脑肿瘤；乳癌；子宫颈癌；慢性髓细胞白血病；肠癌；T 区域淋巴瘤；子宫内膜组织异位；食道癌；胆囊癌；尤恩氏癌；头颈癌；舌癌；霍奇金氏病；卡波西氏病；肾癌；肝癌；肺癌；间皮瘤、多发性骨髓瘤；神经田细胞瘤；非霍奇金氏淋巴瘤；骨肉瘤；卵巢瘤；神经胶母细胞瘤；乳房瘤；子宫颈瘤；前列腺瘤；胰瘤；阴茎瘤；神网膜胚细胞瘤；皮肤癌；胃癌；甲状腺癌；子宫瘤；阴道瘤；威而斯氏肿瘤；或营养层瘤。“放射敏感化物”或“照射敏感化物”，为本发明目的，系有关在体内增加细胞对电磁辐射的照射（例如 X-射线）的敏感化，或加速此照射处理的分子。照射敏感化物增加癌细胞对电磁辐射的毒性作用的敏感化。那些在文献中所揭示者包括丝裂霉素 C、5-溴脱氧尿苷和灭滴灵。可能地使用具波长在自 10^{-20} 至 10 米范围内的辐射，优选地 γ 射线（ 10^{-20} 至 10^{-13} 米）、X-射线（ 10^{-11} 至 10^{-9} 米）；紫外辐射（10 纳米至 400 纳米）、可见光（400 纳米至 700 纳米）、红外辐射（700 纳米至 1 毫米）及微波辐射（1 毫米至 30 厘米）。

可由如此疗法治病的疾病特别地为赘瘤疾病、良性或恶性肿瘤和癌症。其他疾病使用电磁辐射的治疗系同样可能的。

本发明现将以参阅随附的图更详细地叙述。

在图 1 中, 人 PARP (人 PARP 1) 及根据本发明的 2 个优选 PARP (人 PARP 2、人 PARP 3、鼠 PARP 3) 的序列对仗。在人 PARP 1 和人 PARP 2、人 PARP 3 或鼠 PARP 3 间的序列一致性系在码框内描述。大多数序列在对仗内指出。人 PARP 1 的锌指基序系位在与氨基酸残基 21 至 56 及 125 至 162 相对应的序列区段上;

在图 2 中, 具不同人组织的 Northern Blot 法在说明根据本发明 PARP 2 和 PARP 3 分子的组织分布。第 1 行: 脑; 第 2 行: 心; 第 3 行: 骨髓肌; 第 4 行: 结肠; 第 5 行: 胸腺; 第 6 行: 脾; 第 7 行: 肾; 第 8 行: 肝; 第 9 行: 肠; 第 10 行: 胎盘; 第 11 行: 肺; 第 12 行: 外周血液白血球; 尺寸标准物 (kb) 的个别位置经指出。

在图 3 中, 具进一步不同人组织的 Northern Blot 法在说明根据本发明 PARP 3 分子的组织分布。第 1 行: 心; 第 2 行: 脑; 第 3 行: 胎盘; 第 4 行: 肺; 第 5 行: 肝; 第 6 行: 骨骼肌; 第 7 行: 肾; 第 8 行: 胰; 尺寸标准物 (kb) 的个别位置经指出。

在图 4 中, 具不同人组织的 Western Blot 法在说明在蛋白质量下根据本发明 PARP 3 分子的组织分布。第 1 行: 心; 第 2 行: 肺; 第 3 行: 肝; 第 4 行: 脾; 第 5 行: 肾; 第 6 行: 结肠; 第 7 行: 肌肉; 第 8 行: 脑; 尺寸标准物 (kb) 的个别位置经指出。

在图 5 中, 具不同人组织的 Western Blot 法在说明根据本发明 PARP 3 分子的组织分布。第 1 行: 额皮质; 第 2 行: 后皮质; 第 3 行: 小脑; 第 4 行: 海马; 第 5 行: 嗅蕾; 第 6 行: 纹状体; 第 7 行: 丘脑; 第 8 行: 中脑; 第 9 行: 侧皮质; 第 10 行: 脑桥; 第 11 行: 质髓; 第 12 行: 脊髓。

在图 6 中, PARP 分析法 (ELISA) 的图式表示。

在图 7 中, PARP 分析法 (HTRF) 的图式表示。

本发明的进一步优选具体实施例系述于以下节中。

PARP 同系物及功能性相当物

除非另有说明, 为本说明书目的, 氨基酸序列经指示以 N 端开始。若为氨基酸使用 1 字码时, 然后 G 为甘氨酸、A 为丙氨酸、V 为缬氨酸、L 为亮氨酸、I 为异亮氨酸、S 为丝氨酸、T 为苏氨酸、D 为天冬氨酸、N 为天冬酰胺、E 为谷氨酸、Q 为谷氨酰胺、W 为色氨酸、H 为组氨酸、

R 为精氨酸、P 为脯氨酸、K 为赖氨酸、Y 为酪氨酸、F 为苯丙氨酸、C 为半胱氨酸及 M 为甲硫氨酸。

5 本发明不限制于上述特异的 PARP 同系物。相反地，为其功能性相当物的那些同系物亦包含在内。功能性相当物包括天然，例如种特异或器官特异的，及在此所述特异蛋白质的人工制备变异体。根据本发明的功能性相当物由添加、取代、反转、插入和/或删除人 PARP 2 (SEQ ID NO: 2)、人 PARP 3 (SEQ ID NO: 4 和 6) 及鼠 PARP 3 (SEQ ID NO: 8 和 10) 的 1 或多个氨基酸残基而不同，其至少保守由功能性催化 C-端结构域所介导蛋白质的 NAD-结合功能。同样地，优选地保守聚(ADP-核糖)生成的催化活性。功能性相当物在适当时，亦包括那些变异体，其中与亮氨酸接链相似的区域当必要时保守着。

再者，可能地例如自人 PARP 2 或人 PARP 3 的序列出发，由那些具相似物理化学性质的氨基酸（容积、碱性、疏水性等）置换一些氨基酸。可能地，例如精氨酸由赖氨酸残基置换，缬氨酸残基由异亮氨酸残基或天冬氨酸残基由谷氨酸残基置换。然而，亦可能的在序列中 1 或多个氨基酸经交换，添加或删除，或此些方法合并使用。已以此方式自人 PARP 2 或人 PARP 3 序列修饰的蛋白质与起始序列有至少 60%，优选地至少 75%，极特别佳地至少 85% 的同源性，使用皮尔生和利埔曼的互除法计算，Proc. Natl. Acad. Sci (美国) 85 (5)，1988，2444 - 2448。

20 以下的同源性在氨基酸量和 DNA 量下在人 PARP 1、2 和 3 间测定（快速 A 程式，皮尔生和利埔曼，上引）：

氨基酸同源性：

	百分相同性	在 PARP 签名的百分相同性
PARP 1/PARP 2	41.97% (517)	85% (50)
PARP 1/PARP 3	33.81% (565)	53.1% (49)
PARP 2/PARP 3	35.20% (537)	53.1% (49)

括弧内的数字指出重叠氨基酸的数字。

25

DNA 同源性：

	在 ORF 的百分相同性	在 PARP 签名的百分相同性
--	--------------	-----------------

PARP 1/PARP 2	60.81 % (467)	77.85 % (149)
PARP 1/PARP 3	58.81 % (420)	59.02 % (61)
PARP 2/PARP 3	60.22 % (269)	86.36 % (22)

括弧内的数字指出重叠核苷酸的数字。

根据本发明的多肽可归类为均相的聚 (ADP-核糖) 聚合酶, 基于在催化结构域区域的极大相似性。

5 对本发明亦必要地, 这种新的 PARP 同系物不具传统的锌指基序。此意味着这些酶不必要涉及 DNA 修复或以不同于 PARP 1 的方式修复, 但仍能进行其病理机制 (NAD⁺ 消耗及因此因 ATP 消耗的能量消耗)。在 Western Blot 法中可见的强蛋白质表达, 特别地 PARP 3, 表明它在 NAD 消耗中的显著角色。此对药物发展特别重要。根据本发明聚合酶的潜在新颖抑制剂因此可抑制病理功能, 而对想要的生理性质不具不利作用。此对目前已知对抗 PARP 的抑制剂是不可能的, 因为其总是亦抑制 DNA 修复功能。已知 PARP 抑制剂的潜在致癌作用因此易于了解。亦可理解地, 在设计 PARP 抑制剂使其在高亲和力下有效地抑制所有 PARP 同系物。在这种情形下, 依需要而定的这种潜在作用是可以预料的。

根据本发明优选的 PARP 同系物及示于 SEQ ID NO: 2 (人 PARP 2), 有利地自人脑、心、骨骼肌、肾和肝分离。人 PARP 2 在其他组织或器官的表达明显地较弱。

20 根据本发明优选的 PARP 同系物及示于 SEQ ID NO: 4 和 6 (人 PARP 3), 可有利地自人脑 (在此例中, 极佳地自海马)、心、骨骼肌、肝或肾。人 PARP 3 在其他组织或器官的表达, 如肌肉或肝, 明显地较弱。

25 熟谙蛋白质分离者将利用制备方法的组合, 其在各例中最适合自组织中分离根据本发明的天然 PARP, 或自细胞培养液中重组体制备根据本发明的 PARP。合适的标准制备方法例如, 述于 Cooper, T. G., 生物化学方法, 由华特孔拉特出版, 柏林, 纽约或于 Scopes, R. 蛋白质纯化, Springer Verlag, 纽约、海德堡、柏林。

本发明附加地有关 PARP 2 和 PARP 3 同系物, 虽然其可自其他真

核生物种分离，即无脊椎动物类或脊椎动物类，特别地其他哺乳动物，例如小鼠、大鼠、猫、狗、猪、绵羊、牛、马或猴子，或自其他器官例如心肌分离，其具由根据本发明的 PARP 预定的必要结构和功能性质。

特别是，可自人脑分离的人 PARP 2 及其功能性相当物为发展神经退化疾病例如中风的抑制剂的优选剂。因为可假定地，基于 PARP 2 作为指示剂的药物发展可能地发展最适合用于人脑的抑制剂。然而，可排除基于 PARP 2 发展的抑制剂，在其他器官中治疗 PARP 介导的病理状态的应用（见根据本发明蛋白质的组织分布）。

与 PARP 1 相似的 PARP 2 及假定地 PARP 3 亦由受伤的 DNA 活化，但由假定的不同机制。在 DNA 修复的意义是可理解的。根据本发明的 PARP 封阻在如癌症的指示中亦应为有利的（例如在肿瘤病患的放射敏感化中）。

根据本发明的 PARP 及其功能性相当物的另一个必需生物学性质是使与相互作用配偶体结合的能力为可视的。人 PARP 2 和 3 不同于自高等真核生物如，特别地哺乳动物的前面揭示 PARP，在于具潜在所谓亮氨酸拉链基序。此为蛋白质-蛋白质相互作用的典型基序。可能地，这些基序由相互作用配偶体允许 PARP 活性的调整。此附加的结构元件因此亦提供可能的起始点，以发展 PARP 效应物，例如抑制剂。

本发明因此进一步有关可与 PARP 2 和/或 3 相互作用的蛋白质，优选地那些可引起其活化或去活化者。

本发明进一步有关蛋白质，其仍具上述配体结合活性，其可自具体公开的氨基酸序列开始经定向修饰制备。

可能地采用自根据本发明蛋白质的肽序列出发制备合成肽，单独或组合，作为产生多克隆或单克隆抗体的抗原。亦可能地，采用 PARP 蛋白质或其片段以生成抗体。本发明因此亦有关根据本发明 PARP 蛋白质的肽片段，其包括特性化部分序列，特别地那些寡或多肽者，其包括至少一个上述的序列基序。此型的片段可例如由蛋白水解消化 PARP 蛋白质或由肽的化学合成获得。

新颖特异的 PARP 2 和 PARP 3 结合配偶体

对抗根据本发明蛋白质的活性和优选地选择性抑制剂使用上述为 PARP 2 和 PARP 3 的结合配偶体的特异分析法系统发展。这些抑制剂

视情况亦相对 PARP 1 有效。

根据本发明提供的抑制剂对 PARP 2 具强抑制活性。 K_i 值在此例中可少于约 1000 纳摩尔浓度，如少于约 700 纳摩尔浓度，少于约 200 纳摩尔浓度或少于约 30 纳摩尔浓度，例如约 1 至 20 纳摩尔浓度。

- 5 根据本发明的抑制剂亦可对 PARP 2 具惊人的选择性。此由根据本发明如此抑制剂的 $K_i(\text{PARP 1}) : K_i(\text{PARP 2})$ 比值所示，其例如大于 3 或大于 5，如例如大于 10 或大于 20。

应提及的实例为 4 - (N - (4 - 羟基苯基) 胺基甲基) - (2H) - 2,3 二氮杂萘 - 1 - 酮。此及其他类似化合物的制备可根据以下进行：

- 10 Puodzhyunas 等人, Pharm. Chem. J. 1973, 7, 566 或 Mazkanowa 等人, Zh. Obshch. Khim., 1958, 28, 2798 或 Mohamed 等人, Ind. J. Chem. B., 1994, 33, 769, 各自引入作为参考。

以上鉴定的化合物显示 PARP 2 的 K_i 值为 113 纳摩尔浓度及相对于 PARP 3, 对 PARP 2 有 8 倍选择性。

- 15 编码 PARP 同系物的核酸：

除非另有说明，核苷酸序列在本说明书系指示自 5' 至 3' 方向。

- 本发明进一步有关编码上述蛋白质的核酸序列，特别地那些具在 SEQ ID NO: 2、4、6、8 和 10 中描述的氨基酸序列者，但不限于此。根据本发明可使用的核酸序列亦包括等位基因变异体，如以上所述为氨基酸序列，其可由删除、反转、插入、添加和/或取代核苷酸获得，优选地在 SEQ ID NO: 1、3、7 和 9 中所示的核苷酸，但必要地保守相对应基因产物的生物性质和生物活性。可使用的核苷酸序列例如可由导致沉默的核苷酸取代（而未改变氨基酸序列）或保守氨基酸变化的核苷酸取代（交换相似尺寸、电荷、极性或溶解度的氨基酸）获得。

- 25 根据本发明的核酸序列亦包含基因的功能性相当物，如真核生物同源物，例如自非脊椎动物如 *Caenorhabditis* 如果蝇，或脊椎动物，优选地自上述的哺乳动物。优选的基因为那些自脊椎动物者，其编码具如上述的本发明必要性质的基因产物。

根据本发明的核酸可以传统方式由不同途径获得：

- 30 例如，基因组或 cDNA 库可筛选编码 PARP 分子或其部分的 DNA。例如，自人脑、心或肾获得的 cDNA 库可以合适的探针筛选标记的单链

DNA 片段，其与合适长度选自 SEQ ID NO: 1 或 3 的部分序列，或与其互补的序列相对应。为此目的，可能地例如已转移至合适克隆载体的 DNA 库片段，在转化至细菌后，在琼脂板上涂板培养。克隆然后转至硝酸纤维素滤纸，及在 DNA 变性后，与标记探针杂交。阳性克隆然后经分离及特性化。

编码根据本发明的 PARP 同系物或部分片段的 DNA 亦可自本发明内含的序列资料开始而化学合成。例如，可能地为此目的，具约 100 个碱基长度的寡核苷酸以本质上已知的方式，由例如提供合适的末端限制裂解位点而合成及依序连结。

根据本发明的核苷酸序列亦可藉聚合酶链反应 (PCR) 制备。为此，靶物 DNA，例如自合适长度克隆的 DNA 与一对合成寡核苷酸引物杂交，其具约 15 个碱基的长度及其结合至靶物 DNA 的相反端。位在其间的序列区段然后以 DNA 聚合酶填入。此循环重复许多次使靶物 DNA 扩增 (参阅怀特等人 (1989)，基因学趋势 5, 185)。

根据本发明的核酸序列亦当然地包括截短序列、编码和非编码的单链 DNA 或 RNA、互补 DNA 序列、mRNA 序列及自其衍生的 cDNA。

本发明进一步包括在严格条件下与以上序列杂交的核苷酸序列。严格的杂交条件，为本发明目的，在杂交序列具约 70 至 100% 同源性时存在，例如约 80 至 100% 或 90 至 100% (优选地至少约 40，例如约 50、100、150、200、400 或 500 个氨基酸的氨基酸区段中)。

筛选 DNA，特别地 cDNA 库的严格条件在杂交混合液以 0.1X SSC 缓冲液 (20X SSC 缓冲液 = 3 摩尔浓度 NaCl、0.3 摩尔浓度柠檬酸钠，pH 7.0) 和 0.1% SDS 在约 60℃ 的温度下清洗时存在。

Northern Blot 分析，例如，在约 65℃ 的温度以 0.1X SSC, 0.1% SDS 的严格条件下分析及清洗。

核酸衍生物及表达构建物：

核酸序列当然地亦包括衍生物，例如启动子变异体或可替代性的剪切变异体。操作地连结至根据本发明核苷酸序列上游的启动子可再由核苷酸添加或取代、反转、插入和/或删除修饰，但不减弱启动子的功能性或活性。启动子亦可由修饰其序列而具增加的活性，或由更有效的启动子，甚至来自异种生物的启动子，完全取代。上述的启动子可经用以制

备根据本发明的表达盒。

可提及的人 PARP 2 剪接变异体的特定实例为：

变异体人 PARP 2a: 删除碱基对 766 至 904(参阅 SEQ ID NO: 1)。此导致具新的终止密码子的移码(“TAA”相对应于 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 922 至 924)。

变异体人 PARP 2b: 在核苷酸 204 (SEQ ID NO: 1) 后插入 5'-gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg-3'。这样一来, 以插入物: GMPGRSWASKRVS 延伸氨基酸序列

核酸衍生物亦指变异体, 其在起始密码子前面自 -1 至 -1000 区域内的核苷酸序列已经修饰, 使基因表达和/或蛋白质表达增加。

除上述的核苷酸序列外, 根据本发明可使用的核酸构建物在功能性、操作连结中已包括 1 或多个其他的调节序列, 如启动子、扩增信号、增强子、聚腺苷化序列、复制起点、报告基因、可选定标记基因及类似物。此连结可, 根据所要的用途, 导致基因表达的增加或降低。

在新颖调节序列的外, 可能地天然调节序列仍存在于真实结构基因前面。此天然调节可在适当时由基因修饰而关闭, 以增加或降低的基因表达。然而, 基因构建物亦可具更简单的结构, 即无附加的调节信号插在结构基因前面, 及其调节的天然启动子并未经删除。或者, 天然调节序列以一种方式突变, 使调节不再发生, 及基因表达经增强或削弱。亦可能地在核酸序列的 3' 端上插入附加的有利的调节元件。核酸序列可以在基因构建物中以 1 或多拷贝存在。

根据本发明表达方法的有利调节序列例如存在于启动子中, 如 cos、tac、trp、tet、trp-tet、lpp、lac、lpp-lac、lacI_g、T7、T5、T3、gal、trc、ara、SP6、1-PR 或 1-PL 启动子, 其有利地用于革兰氏阴性菌中。其他有利调节序列系存在于例如革兰氏阳性启动子 amy 和 SPO2 中, 于酵母启动子 ADC1、MFa、AC、P-60、CYC1、GAPDH 中或在植物启动子 CaMV/35S、SSU、OCS、lib4、usp、STLS1、B33、nos 中或在遍在蛋白或菜豆蛋白启动子中。

可能地原则上使用具其调节序列的所有天然启动子。亦可能及有利地使用合成的启动子。

那些调节序列意在使核酸序列的特定表达和蛋白质表达成为可

能。此指例如，基于宿主生物，基因仅在诱导后表达或过度表达，或其立即表达和/或过度表达。

调节序列或因子优选地可再对表达具正面影响，及因此增加或降低。因此，调节元件的增强可有利地在转录阶段发生，藉使用强转录信号如启动子和/或增强子。然而，可能地由例如，改进 mRNA 的稳定性而增强转译作用。

增强子指例如 DNA 序列经 RNA 聚合酶和 DNA 间的改进相互作用而增加表达。

重组核酸构建物或基因构建物，为在合适的宿主生物中表达，有利地插入宿主特异的载体中，其使基因在宿主中最适表达成为可能。载体对熟悉熟谙此技艺者系熟知的及可见于例如“克隆载体”(Pouwels P. H. 等人，编者，Elsevier，阿姆斯特丹-纽约-牛津，1985)。除质粒外，载体亦指熟谙此技艺者所知的所有其他载体，例如噬菌体、病毒如 SV40、CMV、杆病毒和腺病毒、转座子、IS 元件、粘粒、柯斯质粒及线性或环状 DNA。此些载体可在宿主生物或染色体复制中经历自我复制。

构建物的表达：

上述根据本发明的重组构建物有利地导入合适的宿主系统中表达。熟谙此技艺者所熟悉的克隆与转移感染方法优选地使用，以期使那些核酸在特殊表达系统中表达。合适的系统描述于例如分子生物学的目前实验计划，F. Ausubel 等人，编者，怀尼内科学，纽约，1997。

合适的宿主生物原则上为所有生物，其可能地表达根据本发明的核酸、其对偶基因变异体、其功能性相当物或衍生物或重组核酸构建物。宿主生物指例如细菌、真菌、酵母、植物或细胞。优选的生物为细菌，如大肠杆菌属，例如大肠杆菌、链霉菌、芽孢杆菌属或假单孢菌属，真核微生物如啤酒酵母菌、霉菌属，动物或植物的高等真核生物的细胞，例如 Sf9 或 CHO 细胞。

基因产物亦可在需要时在导入外来基因生物中表达，如导入外来基因的动物，如特别地小鼠、绵羊或导入外来基因植物。导入外来基因生物亦可为所谓“剔除”的动物或植物，其中相对应的基因关闭，例如由突变或部分或完全删除。

宿主生物和此些生物适当的载体如质粒、病毒或噬菌体，例如具 RNA 聚合酶/启动子系统的质粒、噬菌体 λ 、 μ 或其他温和噬菌或转座子和/或其他有利的调节序列的组合，形成表达系统。表达系统一词优选地指，例如哺乳动物细胞如 CHO 细胞和载体如 pcDNA3neo 载体的组合，
5 其载体适合哺乳动物细胞。

如上述，基因产物亦可有利地在导入外来基因动物，例如小鼠、绵羊或导入外来基因植物中表达。同样可能地计划进行以自核酸衍生的 RNA 的无细胞转译系统。

基因产物亦可以治疗或诊断合适的片段形式表达。为分离重组蛋白
10 质，可能和有利地使用载体系统或寡核苷酸，其由一些核苷酸序列而延伸 cDNA 因此编码供作简化纯化的修饰多肽。此些的合适修饰例如为所谓标志，其作为锚着物着物，例如称为六组氨酸锚着物的修饰，或可由抗体识别为抗原的抗原决定部位（例如述于 Harlow, E. 和 Lane, D., 1988, 抗体：实验室手册。冷泉港（纽约）出版社）。此些锚着物可用
15 以连结蛋白质至固体支持物，例如聚合物基质，其可例如填充至层析柱中，或至微滴度板或至另一个支持物。

此些锚着物亦可在同时用以识别蛋白质。亦可能地使用识别蛋白质的传统标记如荧光染料、酶标记，其在与底物反应后形成可检测的反应产物，或放射性标记、单独或联结着衍生化蛋白质的锚着物。

20 抗体的制备：

抗 - PARP 2 抗体以熟谙此技艺者熟悉的方式制备。抗体指多克隆、单克隆、人或人化抗体或其片段，单链抗体或亦指合成抗体，同样地抗体片段如 Fv、Fab 和 F(ab')₂。合适的制备方法例如述于 Campbell, A. M., 单克隆抗体技术，（1987）Elsevier Verlag, 阿姆斯特丹、纽约、
25 牛津及于 Breitling, F. 和 Dubel, S., 重组抗体（1997），Spektrum Akademischer Verlag, 海德堡。

编码序列的进一步用途：

本 cDNA 附加地提供克隆新颖 PARP 基因的基因组序列基础。此亦包括相关的调节或启动子序列，其例如可由定序位在根据本发明的
30 cDNA 5' 上游或位在基因插入序列的区域获得。cDNA 序列资讯亦藉已知方法的助为制备反义分子或核糖酶的基础（参阅 Jones, J. T. 和

Sallenger, B. A. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 902; Nellen, W. 和 Lichtenstein, C. (1993) TIBS, 18, 419)。基因组 DNA 同样地用以制备上述的基因构建物。

5 使用核苷酸序列或其部分的另一个可能性在产生导入外来基因动物。在合适动物模型中序列资讯的导入外来基因过度表达或基因剔除可提供进一步有价值的资讯，有关新颖基因的（病）生理学。

治疗应用：

10 在普遍缺乏根据本发明的蛋白质的情况中，可能地采用一些置换方法。一方面，天然或重组蛋白质可以其编码核酸（DNA 或 RNA）直接或由基因疗法施用。可能地使用为此的任何合适载体，例如病毒和非病毒载体。合适的方法例如述于由 Strauss 和 Barranger 的基因疗法概念（1997），Walter de Gruyter，出版商。另一个可替代法系由合适的药剂刺激内源基因提供。

15 亦可能地例如由蛋白酶封阻根据本发明 PARP 的周转（turn over）或去活化。最后，根据本发明 PARP 的抑制剂或拮抗剂可采用。

在 PARP 过量存在或过度活化的情况中，不同类型的抑制剂可采用。此抑制可由反义分子、核糖酶、寡核苷酸或抗体，及由低分子量化合物达成。

20 根据本发明的活性物质，即 PARP 蛋白质、核酸和 PARP 结合配偶体例如抗体或调节剂，可以单一治疗活性物质或以与其他治疗活性物质的混合物施用。其可以如此施用，但通常其以医药组合物形式施用，即以活性物质与至少一种合适医药载体或稀释剂的混合物。活性物质或组合物可以适合特殊治疗目的的任何方式，例如口服或肠外施用。

25 医药组合物和医药载体或稀释剂的本质依所要的施用模型而定。口服组合物可例如为片剂或胶囊的形式，及可含惯用赋形剂如粘合剂（例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶或聚乙烯基吡咯烷酮）、填充剂（例如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨糖醇或甘氨酸）、润滑剂（例如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇或二氧化硅）、崩解剂（例如淀粉）或湿润剂（例如月桂基硫酸钠）。口服液体产物可为水性或油性悬
30 浮液、溶液、乳化液、糖浆、酏剂或喷雾剂等的形式，或可为干粉形式，供以水或另一种合适载体复原。此些形式的液体产物可含传统添加物，

例如悬浮剂、香味剂、稀释剂或乳化剂。可能地采用肠外施用溶液或悬浮液及传统的医药载体。根据本发明活性物质的肠外施用有利地使用医药组合物进行，其可以肠外，特别地静脉内施用。此在适合此目的的医药可接受载体中优选地含有效量的至少一种活性物质，优选地以溶解形式。适合此目的的医药载体实例特别地为水溶液，例如生理盐水、磷酸盐缓冲盐水、林格氏液、林格氏乳酸溶液及类似物。再者，组合物可含进一步添加物如抗氧化剂、螯合剂或抗微生物剂。

在各例中根据本发明活性物质剂量的选定及特殊施剂时程系为治疗医师的决定。后者将选择合适的剂量及适当的施剂时程，根据选定的施用途径、在各例中医药的效力、要治疗疾病的本质和严重性及病人的状况和其对治疗的反应。因此，例如药理活性物质可以约 0.5 毫克至约 100 毫克每千克体重和天的剂量施至哺乳动物（人或动物）。其可以单一剂量或以多次剂量施用。

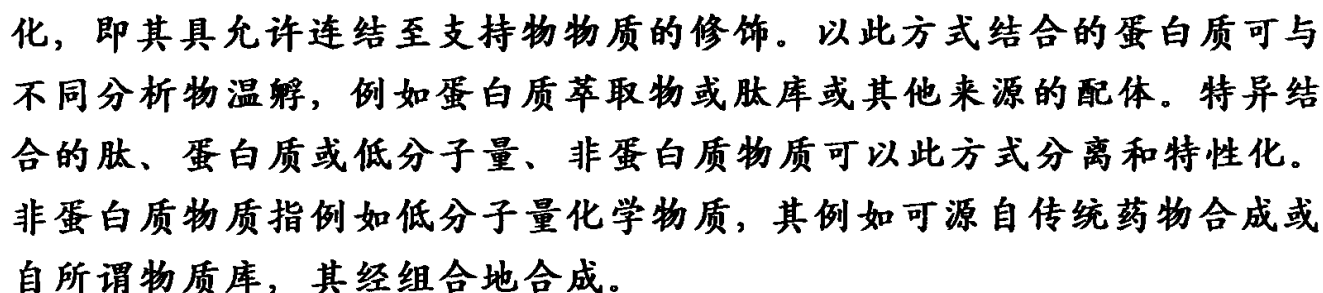
非治疗应用：

根据本发明的核酸，例如 cDNA、基因组 DNA、启动子和多肽及其部分片段，亦可以重组成非重组形式使用，供发展不同的试验系统。

例如，可能地建立试验系统，其在试验物质存在下适合测定启动子或蛋白质的活性。在此例中测定的方法优选地简单的，例如比色测定、发光测定、荧光测定、免疫或放射性方法，及优选地允许要快速测定的大数目试验物质。此型的试验系适合及有利地供所谓高产量筛选。此些试验系统允许试验物质就其结合至其激动、拮抗或抑制根据本发明的蛋白质进行评估。

在人体中测定根据本发明蛋白质或其潜在 mRNA 的量、活性和分布可用以诊断、以测定倾向及以监测一些疾病。同样地，cDNA 序列及基因序列可提供有关一些疾病的基因因素和倾向资讯。可能地为此目的使用多种类和形式的 DNA/RNA 探针和抗体。根据本发明的核苷酸序列或其部分可进一步以适当探针的形式使用，以检测点突变、删除或插入。

根据本发明的蛋白质可进一步用以鉴定及分离其天然配体或相互作用配偶体。根据本发明的蛋白质可附加地用以鉴定和分离人工或合成的配体。为此目的，重组制备或纯化的天然蛋白质可以一种方式衍生



配体或相互作用配偶体亦可由如酵母 2-杂交系统的方法鉴定 (Fields, S. 和 Song, O. (1989) 自然, 340, 245)。可在此例中采用的表达库可例如衍生自人组织, 例如脑、心、肾等。

根据本发明蛋白质在那些指示的相关性系使用特定的抑制剂在相关的动物模型中确认。

实施例 1: PARP 2 和 PARP 3 cDNA 的分离

实施例 2: PARP 2 和 PARP 3 在人体组织的表达

26

修饰以进行与添加鲱鱼精子 DNA (10 毫克/毫升杂交溶液) 的预杂交: 2x1h。杂交与添加鲱鱼精子 DNA (10 毫克/毫升杂交溶液) 然后进行过夜。条带使用 CDP-星实验计划 (BOEHRINGER MANNHEIM CDP-星™ 货号 1685 627) 检测。

- 5 严格清洗后, PARP 2 的转录本主要在人脑、心、骨骼肌、肾和肝中检出。约 1.9 kb 的转录本尺寸与 cDNA 测定的长度 (1.85 kb) 相对应 (参阅图 2(A))。

在其他组织或器官中, 人 PARP 2 表达系相当地弱。

- 10 严格清洗后, PARP 3 的转录本主要在心、脑、肾、骨骼肌和肝中检出。在其他组织 (胎盘、肺、胰) 中表达系明显较弱 (参阅图 2(B))。人 PARP 3 至少有 2 个转录本, 其假定地可由不同聚腺苷化部位或可替代剪接解释。其尺寸 (分别地约 2.2 kb 和 2.5 kb) 与 cDNA 测定的长度 (2.3 kb) 相对应。清洗以 $0.2 \times \text{SSC}/0.2\% \text{ SDS}$ 在室温下进行 2×15 分及然后以 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ 在 65°C 下 2×15 分 (自 $20 \times \text{SSC}$: 3 摩尔浓度 NaCl, 0.3 摩尔浓度柠檬酸钠, pH 7.0 制备)。
- 15

实施例 3: 抗体的制备

制备抗根据本发明蛋白质的特定抗体。这些特别用于分析在 PARP2 和 PARP3 的蛋白质水平上的组织分布, 使用免疫印迹 (Western Blot) 分析。如此抗体制备的实施例经示于下。

- 20 以下的肽由合成法以熟谙抗体制备者所熟悉的方式制备。在一些例中, 半胱氨酸残基经连结至序列的 N 或 C 端, 以期促进偶合至 KLH (匙孔槭血蓝蛋白)。

PARP-2: NH_2 -MAARRRRSTGGGRARALNES- CO_2H (氨基酸 1-20; SEQ ID NO: 23)

- 25 NH_2 -KTELQSPEHPLDQHYRNLHC- CO_2H (氨基酸 335-353; SEQ ID NO: 24)

PARP-3: NH_2 -CKGRQAGREEDPFRSTAEALK- CO_2H (氨基酸 25-44; SEQ ID NO: 25)

- 30 NH_2 -CKQQIARGFEALEALEEALK- CO_2H (氨基酸 230-248; SEQ ID NO: 26)

抗 PARP 3 抗体的制备经述为代表性样品。

多株抗体使用具肽序列 $\text{H}_2\text{N} - \text{KQQIARG} - \text{FEALEALEEALK} - \text{CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NO: 27) (人 PARP 3 蛋白质序列的氨基酸 230 - 248) 的合成肽在兔子中产生人 PARP 3。相对应的小鼠序列在此区域仅以 1 个氨基酸不同 ($\text{H}_2\text{N} - \text{KQQIARGFEALEALEEAMK} - \text{CO}_2\text{H}$; SEQ ID NO: 28)。半胱氨酸亦连结至 N 端, 以期可能地使蛋白质偶合至 KLH。

兔子以 KLH - 肽共轭物在 7 - 14 天时段下免疫化总计 5 次。得到抗血清使用抗原经亲和力纯化。特异 IgG 级分自血清使用个别肽分离, 为此目的, 其以熟谙此技艺者所熟知的方式先固定在亲和层析柱上。个别抗血清经载入此亲和层析柱, 及未特异吸收的蛋白质以缓冲液溶析。特异结合 IgG 级分以 0.2 摩尔浓度甘氨酸/HCl 缓冲液 pH 2.2 溶析。pH 立即使用 1 摩尔浓度 TRIS/HCl 缓冲液调至 pH 7.5。含 IgG 级分的洗脱液与饱和硫酸铵溶液混合 1:1 (体积) 及在 +4℃ 下培养 30 分以完成沉淀。生成的沉淀物在 10,000 g 下离心及, 在除去上清液, 溶于最小量的 PBS/TBS。生成的溶液然后对 PBS/TBS 以比值 1:100 (体积) 透析。抗体经调至约 100 微克 IgG/毫升的浓度。以此方式纯化的 PARP 3 抗体具对 PARP 3 的高特异性。虽然小鼠 PARP 3 经识别良好, 但与 PARP1 或 PARP2 并无可见的相互作用。

实施例 4: 组织分布由免疫印迹 (Western Blot) 分析

在蛋白质阶段下的组织分布亦为 PARP2 和 PARP3 由免疫印迹 (Western Blot) 分析法探讨。

为蛋白质凝胶的小鼠组织的制备:

组织或细胞使用 Potter 或 Ultra - Turrax 匀浆。为此, 0.5 克组织 (或细胞) 在 5 毫升缓冲液 (10 毫摩尔浓度 Tris - HCl pH 7.5, 1 毫摩尔浓度 EDTA, 6 毫摩尔浓度 MgCl_2)、1 片蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Boehringer Mannheim, 货号: 1836153) 和 benzonase (纯度级 I, 默克) 中在 37℃ 下培养 30 分。制备小鼠的心、肺、肝、脾、肾、肠、肌肉、脑及人胎盘肾细胞 (HEK 293, 人胎盘肾) 的组织样品。

蛋白质凝胶:

由 NOVEX 供应的 NuPAGE 系统根据蛋白质凝胶的指导使用。聚丙烯酰胺凝胶 (NuPAGE 4 - 12% BisTris, NOVEX NP 0321)、展开缓冲液 (MES - 展开缓冲液, NOVEX NP 0002)、抗氧化剂 (NOVEX NP

0005)、蛋白质尺寸标准物(多标记颜色标准物, NOVEX LC 5725)、样品缓冲液(NuPAGE LDS 样品缓冲液(4X), NOVEX NP 0007)经使用。凝胶在 200 伏特的电压下展开 45 分。

Western Blot 法:

5 Western Blot 法使用 NOVEX 系统与指导一致地进行。硝酸纤维素膜(硝酸纤维素孔径 45 微米, NOVEX LC 2001)经使用。转移在 200 毫安培的电流下耗时 1 小时。转移缓冲液包括 50 毫升转移缓冲浓缩液(NOVEX NP 0006)、1 毫升抗氧化剂(NOVEX NP 0002)、100 毫升分析级甲醇及 849 毫升二次蒸馏水。

10 除此方式制备的印迹外, 亦使用的是预制的印迹, 例如自 Chemicon(小鼠脑印迹, Chemicon, 目录号: NS 106 具组织 1. 前皮质, 2. 后皮质, 3. 小脑, 4. 海马, 5. 嗅蕾, 6. 纹状体, 7. 丘脑, 8. 中脑, 9. 侧皮质, 10. 脑桥, 11. 髓质, 12. 骨髓)。

与 PARP 3 的抗体反应:

15 Western Blot 法在 TBST(TBS + 0.3% 吐温 20)中以 5% 干乳粉封阻至少 5 小时(TBS: 100 毫摩尔浓度 Tris pH 7.5, 200 毫摩尔浓度 NaCl)。与第一抗体的抗体反应(稀释 1:1000)在 TBST 中以 5% 干乳粉(见以上)在温和搅拌(垂直旋转器)下在室温下进行至少 2 小时或在 4℃ 下过夜。此接着在 TBST 中清洗 3 次 5 分。与第二抗体(抗兔 IgG, 过氧化酶偶合, SIGMAA-6154, 稀释 1:2000)的培养在 TBST 中以 5% 干乳粉进行 1 小时。此接着清洗 3 次, 每次如上 5 分。其后的检测系基于化学发光法, 使用超光辉套组(皮尔斯, 信号光辉化学发光底物 34095), 如由厂商所述。“Lumi-膜”(化学发光检测膜, Boehringer 货号: 1666916)经使用。膜经展现约 2 分(X-射线展开剂浓缩物, ADEFO - Chemie GmbH)、水合、固定约 4 分(酸固定 85 克/升/AGFA)、水合及然后干燥。

实施例 5: 酶制备

30 为比较, 人 PARP1 在杆病毒系统中以熟谙此技艺者熟悉的方式重组地表达及如述地部分纯化(Shah 等人, 分析生物化学 1995, 227, 1 - 13)。纯度 30 - 50% 的牛 PARP1(c = 0.22 毫克/毫升, 在 25℃ 下比活性 170 纳摩尔浓度 ADP-核糖/分/毫克的总蛋白质)系购自

BIOMOL(货号 SE-165)。人和小鼠 PARP 2 和 PARP 3 在杆病毒系统(Bac-至-Bac 系统, BRL 生命科学)中重组地表达。为此目的, 适当 cDNA 引入 pFASTBAC-1 载体。重组杆病毒 DNA 由重组在大肠杆菌中制备, 接着以适当重组杆病毒 DNA 转染昆虫细胞(Sf9 或 High-Five)。相对应蛋白质的表达由 Western Blot 分析法确认。病毒株以熟谙此技艺者熟悉的方式扩增。大量的重组蛋白质由以 5-10 MOI(感染多重性; 病毒对细胞的比值)以病毒感染 500 毫升昆虫细胞培养物(2×10^6 个细胞/毫升)及培养 3 至 4 天获得。昆虫细胞然后由离心成片, 及蛋白质自片段物纯化。

纯化由熟谙此技艺者所熟悉的蛋白质纯化古典方法进行, 以适当的特异抗体检测酶。在一些例中, 蛋白质亦在 3-胺基苯酰胺亲和层析柱上如所述地经亲和力纯化(Burtscher 等人, Anal Biochem 1986, 152: 285-290)。纯度为 > 90%。

实施例 6: 测定 PARP 2 和 PARP 3 的活性及效应物在 PARP1、PARP2 和 PARP3 上抑制作用的分析法系统

a) 对抗聚(ADP-核糖)的抗体制备

可能地使用聚(ADP-核糖)作为抗原以产生抗聚(ADP-核糖)抗体。抗聚(ADP-核糖)抗体的制备系述于文献中(Kanai Y 等人(1974) Biochem Biophys Res Comm 59: 1, 300-306; Kawamatsu H 等人(1984) 生物化学 23, 3771-3777; Kanai Y 等人(1978) 免疫学 34, 501-508)。

以下特别地经使用: 抗聚(ADP-核糖)抗体(多克隆抗血清, 兔子), BIOMOL; 货号 SA-276, 抗聚(ADP-核糖)抗体(单克隆, 小鼠, 克隆 10H; 融合瘤上清液, 亲和力纯化)。

自融合瘤上清液获得的抗血清或单克隆抗体由蛋白质 A 亲和力层析法以熟谙此技艺者所熟悉的方式纯化。

b) ELISA

材料:

ELISA 颜色试剂: TMB 混料, SIGMA T-8540

96 孔微滴度板(FALCON 微试验 III™ 弹性分析盘, #3912)经涂以组蛋白(SIGMA, H-7755)。组蛋白为此目的以 50 微克/毫升的浓度溶于碳酸盐缓冲液(0.05 摩尔浓度 Na_2HCO_3 ; pH 9.4)。微滴度板的个别孔各与 150 微升此组蛋白溶液在室温下培养至少 2 小时或 4℃ 下过夜。孔然后由添加 150 微升 1% BSA 在碳酸盐缓冲液的溶液(SIGMA, A-7888)在室温下封阻 2

小时。此接着以清洗缓冲液（0.05%吐温 10 在 1 x PBS; PBS（磷酸盐缓冲盐水; Gibco, 货号 10010）: 0.21 克/升 KH_2PO_4 、9 克/升 NaCl 、0.726 克/升 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH 7.4）的 3 次清洗步骤。清洗步骤全在微滴度板清洗器（“哥伦布”微滴度板清洗器, SLT - 实验室仪器, 澳洲）中进行。

5 酶反应所需的是酶反应溶液及底物溶液, 在各例中为预混料。此些溶液的绝对量依所要分析孔数数目而定。

酶反应溶液每孔的组成:

- 4 微升 PARP 反应缓冲液（1 摩尔浓度 Tris - HCl pH 8.0, 1.00 毫摩尔浓度 MgCl_2 , 10 毫摩尔浓度 DTT）
- 10 - 20 纳克 PARP 1（人或牛）或 8 纳克 PARP 2（人或小鼠）
- 4 微升活化 DNA（1 毫克/毫升; SIGMA, D - 4522）
- H_2O 至 40 微升

底物溶液每孔的组成:

- 5 微升 PARP 反应缓冲液（10 x）
- 15 - 0.8 微升 DNA 溶液（10 毫摩尔浓度, SIGMA N - 1511）
- 44 微升水

20 抑制剂经溶于 1 x PARP 反应缓冲液。偶而在较高浓度时用 MDSO 溶解抑制剂最多至 2% 的终浓度。为酶反应, 40 微升的酶反应溶液在导入各孔中及与 10 微升抑制剂溶液培养 10 分。然后由各孔中加入 50 微升底物溶液开始酶反应。反应在室温下进行 30 分及然后由清洗缓冲液清洗 3 次中止。

25 采用的初始抗体为以 1 : 5000 稀释的特异抗聚（ADP - 核糖）抗体。稀释在抗体缓冲液（1% BSA 在 PBS; 0.05% 吐温 20）中进行。第一抗体的培养时间在室温下为 1 小时。在其后以清洗缓冲液清洗 3 次后, 与以 1 : 10,000 稀释在抗体缓冲液的第二抗体（抗小鼠 IgG, Fab 片段, 过氧化酶偶合, Boehringer Mannheim, 货号 1500.686; 抗兔 IgG, 过氧化酶偶合, SIGMA, 货号 A - 6154）在室温下培养 1 小时。以清洗缓冲液清洗 3 次后接着为颜色反应, 各孔使用 100 微升颜色试剂（TMB 混料, SIGMA）在室温下约 15 分。颜色反应由添加 100 微升 2 摩尔浓度 H_2SO_4 中止。其后接着在 ELISA 板阅读机（EAR340AT “易读机”, SLT - 实验室仪器, 澳洲）中立即测定（450 纳米对 620 纳米）。测定原理系图式说明于图 6 中。

用不同浓度绘制量效曲线, 以确定抑制剂的 K_i 值。对特别的抑制剂浓度

数值以一式三份获得。算术平均值使用微软® Excel 决定。IC₅₀ 使用 Microcal® (原点软件 (第 5.0 版) 决定 (“S 形调配”)。IC₅₀ 值的换算系以此方式计算为 K_i 值, 由使用 “校准抑制剂” 进行。 “校准抑制剂” 亦在各分析中测定。 “校准抑制剂” 的 K_i 值在相同的分析法系统中由以熟谙此技艺者所熟悉的方式分析 Dixon 图形决定。

b) HTRF (均相时间解析荧光) 分析法

在根据本发明的 HTRF PARP 分析法中, 组蛋白, 作为由 PARP 修饰的靶物蛋白质, 间接以 XL665 荧光团标记。抗聚 (ADP - 核糖) 抗体直接以 10 氨基酸 - PAR - 氨基酸盐标记。若 XL665 荧光团在空间上在直接邻近时, 其由结合至组蛋白上的聚 (ADP - 核糖) 所确认, 然后可能能量转移。在 665 纳米的放射因此直接与结合抗体量成比例, 因而对应于聚 (ADP - 核糖) 的量。测定的信号因此与 PARP 活性相对应。测定原理经图示说明于图 7 中。使用的物质与那些在 ELISA 中使用者完全相同 (见以上), 除非另有说明。

组蛋白以 3 毫克/毫升的浓度溶于 Hepes 缓冲液 (50 毫摩尔浓度, pH = 15 7.5)。生物素化以磺酰基 - NHS - LC - 生物素 (皮尔斯, # 21335T) 进行。使用每个组蛋白 4 个生物素分子的摩尔比值。培养时间为 90 分 (RT)。生物素化组蛋白然后在 G25 SF HR10/10 管柱 (Pharmacia, 17-0591-01) 上在 Hepes 缓冲液 (50 毫摩尔浓度, pH = 7.0) 中纯化, 以期除去过量的生物素化试剂。抗聚 (ADP - 核糖) 抗体以氨基酸盐标记, 使用二功能性偶合试剂 20 (Lopez, E. 等人, Clin. Chem. 39 (2), 196 - 201 (1993); 美国专利号 5, 534, 622)。纯化在 G25SF HR10/30 管柱上进行。每个抗体 3.1 个氨基酸盐的摩尔比值经达成。产量为 25%。共轭物在 0.1% BSA 的存在下在磷酸盐缓冲液 (0.1 摩尔浓度, pH = 7) 中在 -80℃ 下保存。

为酶反应, 以下经吸入各孔中:

25 - 10 微升 PARP 溶液, 在 PARP HTRF 反应缓冲液 (50 毫摩尔浓度 Tris - HCl pH 8.0, 10 毫摩尔浓度 MgCl₂, 1 毫摩尔浓度 DTT), 具 20 纳克 PARP 1 (人或牛) 或 8 纳克 PARP 2 (人或小鼠)

- 10 微升活化 DNA, 在 PARP HTRF 反应缓冲液 (50 微克/毫升)

- 10 微升生物素化组蛋白, 在 PARP HTRF 反应缓冲液 (1.25 微摩尔浓度)

30 - 10 微升抑制剂在 PARP HTRF 反应缓冲液

此些试剂在反应由添加以下开始前经培养 2 分

- 10 微升 DNA 溶液, 在 PARP HTRF 反应缓冲液 (41 微摩尔浓度/毫升)。

反应时间在室温下为 30 分。

反应然后由添加以下中止

- 10 微升 PARP 抑制剂 (25 微摩尔浓度, $K_i = 10$ 纳摩尔浓度), 在“启示 (Revelation)”缓冲液 (100 毫摩尔浓度 Tris - HCl pH 7.2, 0.2 摩尔浓度 KF, 0.05 % BSA)。

以下然后加入:

- 10 微升 EDTA 溶液 (SIGMA, E - 7889, 0.5 摩尔浓度在 H_2O 中)
- 100 微升 Sa - XL665 (Packard 仪器) 在“启示”缓冲液 (15 - 31.25 纳摩尔浓度)
- 50 微升抗 PAR 氨基酸盐在“启示”缓冲液 (1.6 - 3.3 纳摩尔浓度)。

测定在 30 分 (多至 4 小时) 后为可能的。测定在“发现 HTRF 微滴度板分析器” (Canberra Packard 仪器) 中进行。 K_i 值如所述为 ELISA 地计算。

实施例 7: 测定 PARP 抑制剂的治疗效力的试验系统

- 15 新颖 PARP 抑制剂可具其在有关药理模型中检查的治疗效力。一些合适的模型实例经列表于表 1。

疾病	模型	文献
神经变性疾病 (中风, 帕金森氏症等)	在小鼠或大鼠中的 NMDA 激发毒性	见以下说明
中风	永久性 MCAO (“中脑动脉闭塞”)	Tokime, T, 等人, J. Cereb. Blood Flow Metab. 18 (9): 991 - 7, 1998. Guegan, C., 脑研究. 分子脑研究, 55 (1): 133 - 40, 1998.
	在大鼠或小鼠中的短暂、病灶的 MCAO	Eliasson MJL, 等人, Nat Med 1997, 3: 1089 - 1095. Endres, M, 等人, J. Cereb Blood Flow Metab 1997, 17: 1143 -

		1151. Takahashi K. 等人, J. Cereb Blood Flow Metab 1997, 17: 1137 - 1142.
帕金森氏症	在小鼠/大鼠中的 MPTP (1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶) 毒性	Cosi C, 等人, 脑研究, 1998, 809 (1): 58 - 67. Cosi C, 等人, 脑研究, 1996, 729 (2): 264 - 9.
心肌梗塞	在大鼠、猪或兔子中的冠状血管闭塞	Richard V, 等人, Br. J. Pharmacol 1994, 113, 869 - 876. Thiemermann C, 等人, Proc Natl Acad Sci 美国 1997, 94(2): 679 - 83. Zingarelli B, 等人, Cardiovasc Res. 1997, 36 (2): 205 - 15.
	在大鼠或兔子中的 Langendorff 心模型	见以下说明

脓毒性休克	在大鼠中的内毒素休克	Szabo C, 等人, J Clin Invest, 1997, 100 (3): 723 - 35.
	在大鼠或小鼠中的酵母聚糖 - 或红藻胶诱生的多器官衰竭	Szabo C, 等人, J Exp Med. 1997, 186 (7): 1041 - 9. Cuzzocrea S, 等人, Eur J Pharmacol. 1998, 342 (1): 67 - 76.
类风湿性关节炎	在大鼠或小鼠中的佐剂 - 或明胶诱生的关节炎	Szabo C, 等人, Proc. Natl Acad Sci 美国 1998, 85 (7): 3867 - 72.
糖尿病	链霉亚硝基素 - 或嘌呤 - 诱生或肥胖 - 有关的	Uchigata Y 等人, 糖尿病 1983, 32: 316 - 318. Masiello P, 等人, 糖尿病学 1985, 28: 683 - 686.

		Shimabukuro M 等人, J. Clin Invest 1997, 100: 290 - 295.
癌症	体外模型; 见以下	Schlicker 等人, 1999, 75 (1), 91 - 100.

a) NMDA 激发毒性模型

谷氨酸为在脑中最重要激发神经传递质。在正常情况下, 谷氨酸排至突触裂隙及刺激后突触谷氨酸受体, 特定地“NMDA”和“AMPA”型的谷氨酸受体。此刺激在脑的多种功能中扮演显著角色, 包括学习、记忆和运动控制。

在急性和慢性神经变性的情况(例如中风)下, 突触谷氨酸分泌上大为增加, 造成受体的过度刺激。此导致以此方式刺激的细胞死亡。这些增加的谷氨酸活性发生在多数神经疾病或精神疾病中, 及导致在中枢神经系统(CNS)以及在外周神经系统中过度激发的状态或毒性作用。因此, 谷氨酸系涉及大量的神经变性疾病, 特别地组织缺氧后的神经毒性混乱、缺氧、局部缺血及损伤后, 如那些在中风和重伤后发生者, 及中风、阿尔兹海默氏症、哈丁顿氏症、肌萎缩侧索硬化症(ALS; “路者林氏病”), 颅外伤、脊髓重伤、外周神经病痛、AIDS 痴呆和帕金森氏症。谷氨酸在其中起重要作用的另一种疾病为癫痫(参阅脑研究公告 1998; 46 (4): 281 - 309, Eur Neuropsychopharmacol. 1998, 8 (2): 141 - 152)。

谷氨酸作用系经不同受体介导。此些受体之一在特定激动剂后称为 NMDA (N-甲基-D-天冬氨酸) 受体 (Arzneim. Forschung 1990, 40, 511 - 514; TIPS, 1990, 11, 334 - 338; 未来的药物 1989, 14, 1059 - 1071)。N-甲基-D-天冬氨酸为特别类谷氨酸受体的强激动剂(“NMDA”型)。NMDA 受体的刺激导致钙流入细胞及生成自由基。自由基导致 DNA 损伤及 PARP 活化。PARP 在细胞中耗尽高能量磷酸盐(NAD 和 ATP)导致细胞死亡。这说明 NMDA 的毒性。NMDA 治疗的动物因此可认为是上述疾病的模型, 其中涉及激发毒性。

因为谷氨酸受体在神经变性的重要性, 许多药理研究途径目前已指向准确地特定封阻此些受体。然而, 因为其在正常刺激传导的重要性, 此些研究途径已被证明为有问题的(副作用)。此外, 受体的刺激发生极快速, 使受体

的施用时常太迟（“时窗”问题）。因此，对 NMDA 有关神经毒性的新颖作用理论及抑制剂有着极大的需求。

由激发氨基酸对抗脑过度激发的保护（在小鼠中的 NMDA 拮抗作用）可视为基于激发毒性的 PARP 药理效应物在疾病中活性的适当证据。激发（exzitatorischen）氨基酸（EAA）的脑内施用诱生如此有力的过度激发，其在短时间内导致动物（小鼠）的痉挛和死亡。

在本例中，在腹膜（i. p.）施用试验物质 120 分后单侧脑室内施用 10 微升 0.035% NMDA 水溶液。这些症状可由中枢活性的药物的全身性，例如腹膜内施用抑制。因为在中枢神经系统中 EAA 受体的过度活化在不同神经疾病中起重要作用，可通过体内检测 EAA 拮抗作用而获得有关物质对如此 CNS 疾病的可能治疗有效性的资讯。ED50 是指先前 i. p.施用测定的物质后，其中 50% 动物不具固定剂量 NMDA 所有的症状时测定的物质活性的测定值。

b) Langendorf 心模型（心肌梗塞模型）

雄性 Sprague - Dawley 大鼠（体重 300 - 400 克；原种珍维尔，Le Genest - St - Isle，法国）经用于此试验，大鼠由灌食法口服施以活性物质或安慰剂（体积：5 毫升/千克）。50 分后，肝素经腹膜内施用（Liquemin N Roche, 125 IU/动物，0.5 毫升）。动物以 Inactin® T133（硫 β 巴比妥钠 10%）麻醉、固定在手术台上，气管切开及以“哈佛换气泵”（40 下/分，4.5 毫升/下）。胸廓切开后接着主动脉立即插入导管，取出心脏及立即逆行灌注。心脏以 75 毫米汞柱的恒压灌注，其使用“Gilson Miniplus 2 灌注泵”达成。灌注液的组成（毫摩尔/升）：NaCl 118, KCl 4.7, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 2.53, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1.64, NaHCO_3 24.88, KH_2PO_4 1.18, 葡萄糖 11。温度在实验全程保持在 37℃ 下。功能性参数使用“Gould 4 - 轨记录器”连续记录。测定经制成左室压（LVP；毫米汞柱）、LVEDP（毫米汞柱）、酶释出（肌酸激酶，毫单位/毫升/克）、冠状流速（毫升/分）、HR（脉搏率，分⁻¹）。左室压使用液体填充乳胶气球及 Statham 23 Db 压力转导计测定。气球体积先调至达到约 12 毫米汞柱的 LVEDP（左室端舒张压）。 $\text{dp/dt}_{\text{max}}$ （最大泵力）系使用积分基准自压力信号衍生。心率自压力信号计算。流速使用滴计数器（BMT Messtechnik GmbH 柏林）测定。在平衡时间 20 分后，心接受 30 分全体局部缺血，由中止灌注液供给，而保持温度在 37℃ 下。在其后 60 分再灌注时段中，灌注液样品在 3、5、10、15、30、45 和 60 分后取出，分析肌酸激酶（CK）活性。测定参数的平均值及标准偏差经统计分析（Dunnett 试验法）。显著性限度为 $p =$

0.05.

在兔心的实验同样地进行。使用雄性白纽西兰兔（获自：Interfauna）。心如上述大鼠模型制备。灌注压设在最大 60 毫米汞柱及流速在约 25 毫升/分。平衡时间为约 30 分。物质由直接注入心的上游施用。开始注入 15 分后，30 分全体局部缺血由中止流动而致，但维持心脏的温度。接着 30 分的再灌注。灌注液在底物施用前，在 15 分后及在再灌注期间不同时间（5、10、15、20、30 分）时取出探讨 CK 活性。以下参数经测定：LVP（毫米汞柱）、LVEDP、LVdP/dt、PP（毫米汞柱）、HR（脉搏率；下/分）、CK 活性（单位/分/克心重）。

10 c) 急性肾衰竭的动物模型

静脉内施用 PARP 抑制剂（4 天）对具局部缺血后急性肾衰竭的大鼠肾功能的保护作用经探讨。

雄 Sprague - Dawley 大鼠（在实验开始时约 330 克；育种者：Charles River）经使用。每个实验组采用 10 - 15 只动物。活性物质/安慰剂的施用以渗透微泵连续进行至股静脉。眼窝血液在心烯氟烷（Ethrane Abbot, 威斯巴登）吸入麻醉下进行（1.5 毫升全血）。

在最初测定（血样品）及测定在 24 小时中排出尿量后，大鼠经麻醉（“Nembutal”，戊巴比妥钠，Sanofi CEVA；50 毫克/千克，腹膜内，体积注射 1.0 毫升/千克）及固定在可加热的手术台上（37℃）。125 IU/千克肝素（利贵明 N，罗氏）经静脉施至尾静脉。腹腔经打开及右肾经暴露。分枝的肾动脉经暴露及使用牛头犬夹（Diefenbach 38 毫米）在上方夹住。左肾动脉同样地经露出及夹住（上方，约至肾的半途）。在手术期间，渗透微泵经植入股静脉。肠经再放入及流体损失补以微温的 0.9% NaCl。动物经盖以湿布及在红光下保温。40 分后，肾的外观经记录，及夹经取下，先右后左。肠再放回及加入 2 滴抗生素（Tardomyocel, 拜尔）。腹壁以无菌猫肠（Ethicon 4 号）密闭及再一次以 1 滴抗生素处理。表皮以无菌（Ethibond Exel Ethicon）3/0 号缝合，及缝合处喷以 Nebacetin N（Yamanouchi）伤品喷雾。每日药物/安慰剂剂量的 10 分之一经快速浓注给药。

样品和血液在第 1、2 和 4 天实验时取出以探讨在血清和尿中的生化参数：Na、K、肌酸、蛋白质（仅在尿中）。此外，饲料和水消耗、体重和尿量经记录。14 天后，动物经牺牲及肾经评估。

评估排除在实验期间死于梗塞或在第 14 天在验尸时显示梗塞的所有动

物。肌酸清除与钠级分排出被计算为肾功能参数，比较治疗动物与对照组和假阳性对照（Sham）组。

d) 放射敏感化的体外模型（肿瘤疗法）

MCF-7-细胞（人乳癌）在具 10% 热灭活 FCS 和 2 毫摩尔浓度 L-谷氨酸的达贝可氏修饰伊哥氏培养基中培养。细胞在 6 孔盘中以每孔 100、1000 或 10,000 个细胞的细胞密度接种过夜及然暴露至 0 至 10 Gy 范围内剂量的离子辐射（ ^{137}Cs ，雪帕马克，I-68A 型，剂量率 3.28 Gy/分）。照射后 10 天，实验经评估，计算群落，而以 50 个细胞为阳性对照。

e) 中风模型（病灶性脑局部缺血；在大鼠中的 MCA（中脑动脉）闭塞）

病灶性局部缺血在 Sprague - Dawley 或 Long - Evans 大鼠中藉右端 MCA 的导管插入进行。大鼠在 MCA 闭塞前或其后以根据本发明蛋白质的调节剂处理。通常，1-10 毫克/千克的剂量经选定（快速浓注施用），视情况接着连续注入 0.5-5 毫克/千克/小时。

大鼠以卤代烷在 70% 氮气和 30% 氧气的混合物麻醉（4% 在最后时及 0.8-1.2% 在手术期间）。体温固定地直肠测定及藉可控制热毯保持恒定在 $37.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。再者，动脉血压、动脉 pH、 $\text{Pa}(\text{O}_2)$ 和 $\text{Pa}(\text{CO}_2)$ 视情况藉尾静脉导管测定。其后，病灶局部缺血使用 Chen 等人（中风 17: 738-743; 1986）或 Liu 等人（Am J. Physiol 256: H589-593; 1989）的方法进行。藉连续烧灼右 MCA 的远端部分。当手术终止时，动物保持在温暖环境下再 24 小时。然后其使用 CO_2 杀死及断头。其脑经取出，快速冷冻（干冰或液态氮）后保存在 -80°C 下。脑经切成 0.02 毫米厚切片及每第 20 个切片用于其后的分析。相对应的切片以甲酚紫（尼斯尔染色法）染色。可替代地，TTC（2, 3, 4-三苯基四唑氯）可用于染色。梗塞量然后可在显微镜下分析。为正确定量，电脑影像分析软件可使用（J Cereb Blood Flow Metabol 10: 290 - 293; 1990）。

f) 脓毒性休克

每组 10 只雄 C57/BL 小鼠（体重 18-20 克）以 LPS（脂多糖，自大肠杆菌， LD_{100} 20 毫克/动物，静脉内）加入半乳糖胺（20 毫克/动物，静脉内）处理。要试验的物质在 3 个连续天中，腹膜内或静脉内施用（例如 1-10 毫克/千克），而第 1 个剂量在 LPS 处理 30 分后施用。死亡率每 12 小时测定。可替代地，物质亦可以一些剂量在一些日子中施用。

g) 在老化细胞中改变基因表达的测定

- 细胞的老化系由改变细胞培养基自完全培养基至具降低血清浓度的培养基而刺激，及其后藉定量性 PCR 或 Northern Blot 法（Linskens 等人，核酸研究 1995: 23 (16): 3244 - 51）分析。皮肤老化的典型标记例如胶原或弹性蛋白可使用。人纤维胚细胞或纤维胚细胞系经使用，其刺激皮肤老化。根据
- 5 本发明蛋白质的调节剂经加入培养基中及其在改变基因表达的作用经观察。在细胞中增加的弹性蛋白产生与藉那些调节剂所致的降低老化过程可观察到。

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人:

(A) 姓名: **BASF Aktiengesellschaft**

(B) 街道:

(C) 地区: **Ludwigshafen**

(E) 国家: **Deutschland**

(F) 邮编: **67065**

(ii) 发明名称: **新的聚 ADP 核糖聚合物基因**

(iii) 序列数: **28**

(iv) 计算机可读资料

(A) 数据载体: **Floppy disk**

(B) 计算机: **IBM PC compatible**

(C) 操作系统: **PC DOS/MS DOS**

(D) 软件: **PatentIn Release #1.0, Version #1.30**

(EPA)

(2) SEQ ID NO: 1 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: **1843 碱基对**

(B) 种类: **核苷酸**

(C) 链型: **单链**

(D) 拓扑: **线性**

(ii) 分子类型: **cDNA**

(iii) 假说: **非**

(iv) 反义: **非**

(vi) 来源:

(F) 组织类型: **脑**

(ix) 特征:

(A) 名称/键: **CDS**

(B) LAGE: **3..1715**

(D) SONSTIGE ANGABEN: **/product = “聚 ADP**

核糖聚合酶”

(xi) 序列特征: **SEQ ID NO: 1:**

00.12.05

CC ATG GCG GCG CGG CGG CGA CGG AGC ACC GGC GGC GGC AGG GCG AGA
Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg
1 5 10 15

SCA TTA AAT GAA AGC AAA AGA GTT AAT AAT GGC AAC ACG GCT CCA GAA
Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu
20 25 30

00.12.05

GAC TCT TCC CCT GCC AAG AAA ACT CGT AGA TGC CAG AGA CAG GAG TCG Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	143
35 40 45	
AAA AAG ATG CCT GTG GCT GGA GGA AAA GCT AAT AAG GAC AGG ACA GAA Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	191
50 55 60	
GAC AAG CAA GAT GAA TCT GTG AAG GCC TTG CTG TTA AAG GGC AAA GCT Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala	239
65 70 75	
CCT GTG GAC CCA GAG TGT ACA GCC AAG GTG GGG AAG GCT CAT GTG TAT Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr	287
80 85 90 95	
TGT GAA GGA AAT GAT GTC TAT GAT GTC ATG CTA AAT CAG ACC AAT CTC Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu	335
100 105 110	
CAG TTC AAC AAC AAC AAG TAC TAT CTG ATT CAG CTA TTA GAA GAT GAT Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp	383
115 120 125	
GCC CAG AGG AAC TTC AGT GTT TGG ATG AGA TGG GGC CGA GTT GGG AAA Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys	431
130 135 140	
ATG GGA CAG CAC AGC CTG GTG GCT TGT TCA GGC AAT CTC AAC AAG GCC Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala	479
145 150 155	
AAG GAA ATC TTT CAG AAG AAA TTC CTT GAC AAA ACG AAA AAC AAT TGG Lys Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp	527
160 165 170 175	
GAA GAT CGA GAA AAG TTT GAG AAG GTG CCT GGA AAA TAT GAT ATG CTA Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu	575
180 185 190	
CAG ATG GAC TAT GCC ACC AAT ACT CAG GAT GAA GAG GAA ACA AAG AAA Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys	623
195 200 205	
GAG GAA TCT CTT AAA TCT CCC TTG AAG CCA GAG TCA CAG CTA GAT CTT Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu	671
210 215 220	
CGG GTA CAG GAG TTA ATA AAG TTG ATC TGT AAT GTT CAG GCC ATG GAA Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu	719
225 230 235	
GAA ATG ATG ATG GAA ATG AAG TAT AAT ACC AAG AAA GCC CCA CTT GGG Glu Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly	767
240 245 250 255	
AAG CTG ACA GTG GCA CAA ATC AAG GCA GGT TAC CAG TCT CTT AAG AAG Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys	815

00.12.05

260	265	270	
ATT GAG GAT TGT ATT CGG GCT GGC CAG CAT GGA CGA GCT CTC ATG GAA Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu 275 280 285			863
GCA TGC AAT GAA TTC TAC ACC AGG ATT CCG CAT GAC TTT GGA CTC CGT Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg 290 295 300			911
ACT CCT CCA CTA ATC CGG ACA CAG AAG GAA CTG TCA GAA AAA ATA CAA Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln 305 310 315			959
TTA CTA GAG GCT TTG GGA GAC ATT GAA ATT GCT ATT AAG CTG GTG AAA Leu Leu Glu Ala Leu Gly Asp Ile Glu Ile Ala Ile Lys Leu Val Lys 320 325 330 335			1007
ACA GAG CTA CAA AGC CCA GAA CAC CCA TTG GAC CAA CAC TAT AGA AAC Thr Glu Leu Gln Ser Pro Glu His Pro Leu Asp Gln His Tyr Arg Asn 340 345 350			1055
CTA CAT TGT GCC TTG CGC CCC CTT GAC CAT GAA AGT TAC GAG TTC AAA Leu His Cys Ala Leu Arg Pro Leu Asp His Glu Ser Tyr Glu Phe Lys 355 360 365			1103
GTG ATT TCC CAG TAC CTA CAA TCT ACC CAT GCT CCC ACA CAC AGC GAC Val Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Ser Thr His Ala Pro Thr His Ser Asp 370 375 380			1151
TAT ACC ATG ACC TTG CTG GAT TTG TTT GAA GTG GAG AAG GAT GGT GAG Tyr Thr Met Thr Leu Leu Asp Leu Phe Glu Val Glu Lys Asp Gly Glu 385 390 395			1199
AAA GAA GCC TTC AGA GAG GAC CTT CAT AAC AGG ATG CTT CTA TGG CAT Lys Glu Ala Phe Arg Glu Asp Leu His Asn Arg Met Leu Leu Trp His 400 405 410 415			1247
GGT TCC AGG ATG AGT AAC TGG GTG GGA ATC TTG AGC CAT GGG CTT CGA Gly Ser Arg Met Ser Asn Trp Val Gly Ile Leu Ser His Gly Leu Arg 420 425 430			1295
ATT GCC CCA CCT GAA GCT CCC ATC ACA GGT TAC ATG TTT GGG AAA GGA Ile Ala Pro Pro Glu Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Met Phe Gly Lys Gly 435 440 445			1343
ATC TAC TTT GCT GAC ATG TCT TCC AAG AGT GCC AAT TAC TGC TTT GCC Ile Tyr Phe Ala Asp Met Ser Ser Lys Ser Ala Asn Tyr Cys Phe Ala 450 455 460			1391
TCT CGC CTA AAG AAT ACA GGA CTG CTG CTC TTA TCA GAG GTA GCT CTA Ser Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu 465 470 475			1439
GGT CAG TGT AAT GAA CTA CTA GAG GCC AAT CCT AAG GCC GAA GGA TTG Gly Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu 480 485 490 495			1487
CTT CAA GGT AAA CAT AGC ACC AAG GGG CTG GGC AAG ATG GCT CCC AGT			1535

00.12.03

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	GGT	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	CAGTGTGTGTA	CTTGTGAATT												1785
TTGTGATATT	TTATGTAATA	AAAACGTAC	AGGTCTAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAA												1843

(2) SEQ ID NO : 2 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 571 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 2:

00.12.05

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	

00.12.05

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

00.12.05

450	455	460
Arg Leu Lys Asn Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Glu Val Ala Leu Gly		
465	470	475 480
Gln Cys Asn Glu Leu Leu Glu Ala Asn Pro Lys Ala Glu Gly Leu Leu		
	485 490	495
Gln Gly Lys His Ser Thr Lys Gly Leu Gly Lys Met Ala Pro Ser Ser		
	500 505	510
Ala His Phe Val Thr Leu Asn Gly Ser Thr Val Pro Leu Gly Pro Ala		
	515 520	525
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	

(2) SEQ ID NO: 3 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2265 碱基对

(B) 种类: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假说: 非

(iv) 反义: 非

(vi) 来源:

(F) 组织类型: 子宫

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) LAGE: 242..1843

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product = “聚 ADP

核糖聚合酶”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 3:

00.12.05

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATGTCCCTGC TTTTCTTGGC	240
C ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT GAG	286
Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu	

00.12.05

575	580	585	
AAG AAG AAG GGC CGG CAG GCA GGA AGG GAG GAG GAC CCC TTC CGC TCC Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser 590 595 600			334
ACC GCT GAG GCC CTC AAG GCC ATA CCC GCA GAG AAG CGC ATA ATC CGC Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg 605 610 615			382
GTG GAT CCA ACA TGT CCA CTC AGC AGC AAC CCC GGG ACC CAG GTG TAT Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr 620 625 630			430
GAG GAC TAC AAC TGC ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GAG AAC AAC AAC Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn 635 640 645 650			478
AAC AAG TTC TAC ATC ATC CAG CTG CTC CAA GAC AGC AAC CGC TTC TTC Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe 655 660 665			526
ACC TGC TGG AAC CGC TGG GGC CGT GTG GGA GAG GTC GGC CAG TCA AAG Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys 670 675 680			574
ATC AAC CAC TTC ACA AGG CTA GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT GAG AAG Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys 685 690 695			622
AAA TTT CGG GAA AAG ACC AAG AAC AAC TGG GCA GAG CGG GAC CAC TTT Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe 700 705 710			670
GTG TCT CAC CCG GGC AAG TAC ACA CTT ATC GAA GTA CAG GCA GAG GAT Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp 715 720 725 730			718
GAG GCC CAG GAA GCT GTG GTG AAG GTG GAC AGA GGC CCA GTG AGG ACT Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg Thr 735 740 745			766
GTG ACT AAG CGG GTG CAG CCC TGC TCC CTG GAC CCA GCC ACG CAG AAG Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Lys 750 755 760			814--
CTC ATC ACT AAC ATC TTC AGC AAG GAG ATG TTC AAG AAC ACC ATG GCC Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met Ala 765 770 775			862
CTC ATG GAC CTG GAT GTG AAG AAG ATG CCC CTG GGA AAG CTG AGC AAG Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser Lys 780 785 790			910
CAA CAG ATT GCA CGG GGT TTC GAG GCC TTG GAG GCG CTG GAG GAG GCC Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala 795 800 805 810			958
CTG AAA GGC CCC ACG GAT GGT GGC CAA AGC CTG GAG GAG CTG TCC TCA			1006

00.12.05

Leu	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser		
				815					820					825			
CAC	TTT	TAC	ACC	GTC	ATC	CCG	CAC	AAC	TTC	GGC	CAC	AGC	CAG	CCC	CCG		1054
His	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro		
			830					835					840				
CCC	ATC	AAT	TCC	CCT	GAG	CTT	CTG	CAG	GCC	AAG	AAG	GAC	ATG	CTG	CTG		1102
Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu		
		845					850					855					
GTG	CTG	GCG	GAC	ATC	GAG	CTG	GCC	CAG	GCC	CTG	CAG	GCA	GTC	TCT	GAG		1150
Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu		
	860					865					870						
CAG	GAG	AAG	ACG	GTG	GAG	GAG	GTG	CCA	CAC	CCC	CTG	GAC	CGA	GAC	TAC		1198
Gln	Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr		
875				880						885					890		
CAG	CTT	CTC	AAG	TGC	CAG	CTG	CAG	CTG	CTA	GAC	TCT	GGA	GCA	CCT	GAG		1246
Gln	Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu		
				895					900					905			
TAC	AAG	GTG	ATA	CAG	ACC	TAC	TTA	GAA	CAG	ACT	GGC	AGC	AAC	CAC	AGG		1294
Tyr	Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Asn	His	Arg		
			910				915						920				
TGC	CCT	ACA	CTT	CAA	CAC	ATC	TGG	AAA	GTA	AAC	CAA	GAA	GGG	GAG	GAA		1342
Cys	Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Glu		
		925					930					935					
GAC	AGA	TTC	CAG	GCC	CAC	TCC	AAA	CTG	GGT	AAT	CGG	AAG	CTG	CTG	TGG		1390
Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Trp		
	940					945					950						
CAT	GGC	ACC	AAC	ATG	GCC	GTG	GTG	GCC	GCC	ATC	CTC	ACT	AGT	GGG	CTC		1438
His	Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu		
955					960					965					970		
CGC	ATC	ATG	CCA	CAT	TCT	GGT	GGG	CGT	GTT	GGC	AAG	GGC	ATC	TAC	TTT		1486
Arg	Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe		
				975				980						985			
GCC	TCA	GAG	AAC	AGC	AAG	TCA	GCT	GGA	TAT	GTT	ATT	GGC	ATG	AAG	TGT		1534
Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Met	Lys	Cys		
			990					995					1000				
GGG	GCC	CAC	CAT	GTC	GGC	TAC	ATG	TTC	CTG	GGT	GAG	GTG	GCC	CTG	GGC		1582
Gly	Ala	His	His	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	Gly		
		1005					1010					1015					
AGA	GAG	CAC	CAT	ATC	AAC	ACG	GAC	AAC	CCC	AGC	TTG	AAG	AGC	CCA	CCT		1630
Arg	Glu	His	His	Ile	Asn	Thr	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Pro		
	1020					1025					1030						
CCT	GGC	TTC	GAC	AGT	GTC	ATT	GCC	CGA	GGC	CAC	ACC	GAG	CCT	GAT	CCG		1678
Pro	Gly	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Gly	His	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro		
1035					1040					1045					1050		

001205

ACC CAG GAC ACT GAG TTG GAG CTG GAT GGC CAG CAA GTG GTG GTG CCC	1726
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro	
1055 1060 1065	
CAG GGC CAG CCT GTG CCC TGC CCA GAG TTC AGC AGC TCC ACA TTC TCC	1774
Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser	
1070 1075 1080	
CAG AGC GAG TAC CTC ATC TAC CAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC	1822
Gln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr	
1085 1090 1095	
CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCCGCCC TGTCCCCCGG GGTCTGCAA	1873
Leu Leu Glu Val His Leu *	
1100 1105	
GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTTT	1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA	1993
CTTATGCCTC CTAAGTGAAT TTTTGTATTC TTTGACACAT CTGCCCAGTC CCTCTCCTCC	2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGGTTCC	2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTGTTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT	2173
AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTTTCAT AAATGACAAG ATTTCCTCCT TTAAAAAAAA	2233
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA	2265

(2) SEQ ID NO : 4 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 534 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 4:

00:12:05

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

00:12:05

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
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
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
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
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
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		

(2) SEQ ID NO: 5 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2265 碱基对

(B) 种类: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假说: 非

(iv) 反义: 非

(vi) 来源:

(F) 组织类型: 子宫

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) LAGE: 221..1843

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product = “聚 ADP

核糖聚合酶”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 5: .

00.12.05

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATG TCC CTG CTT TTC	235
Met Ser Leu Leu Phe	
535	
TTG GCC ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT	283

00:12:05

Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro	
540 545 550 555	
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	
560 565 570	
TCC ACC GCT GAG GCC CTC AAG GGC 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	
575 580 585	
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	
590 595 600	
TAT GAG GAC TAC AAC TGC AGC 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	
605 610 615	
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	
620 625 630 635	
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	
640 645 650	
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	
655 660 665	
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	
670 675 680	
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	
685 690 695	
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	
700 705 710 715	
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	
720 725 730	
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	
735 740 745	
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	
750 755 760	
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	
765 770 775	

00 12 05

800	805	810	
CCG CCC ATC AAT TCC CCT GAG CTT CTG CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG Pro Pro Ile Asn Ser Pro Glu Leu Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu 815 820 825			1099
CTG GTG CTG GCG GAC ATC GAG CTG GCC CAG GCC CTG CAG GCA GTC TCT Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu Ala Gln Ala Leu Gln Ala Val Ser 830 835 840			1147
GAG CAG GAG AAG ACG GTG GAG GAG GTG CCA CAC CCC CTG GAC CGA GAC Glu Gln Glu Lys Thr Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp 845 850 855			1195
TAC CAG CTT CTC AAG TGC CAG CTG CAG CTG CTA GAC TCT GGA GCA CCT Tyr Gln Leu Leu Lys Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Ala Pro 860 865 870 875			1243
GAG TAC AAG GTG ATA CAG ACC TAC TTA GAA CAG ACT GGC AGC AAC CAC Glu Tyr Lys Val Ile Gln Thr Tyr Leu Glu Gln Thr Gly Ser Asn His 880 885 890			1291
AGG TGC CCT ACA CTT CAA CAC ATC TGG AAA GTA AAC CAA GAA GGG GAG Arg Cys Pro Thr Leu Gln His Ile Trp Lys Val Asn Gln Glu Gly Glu 895 900 905			1339
GAA GAC AGA TTC CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGT AAT CGG AAG CTG CTG Glu Asp Arg Phe Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Lys Leu Leu 910 915 920			1387
TGG CAT GGC ACC AAC ATG GCC GTG GTG GCC GCC ATC CTC ACT AGT GGG Trp His Gly Thr Asn Met Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly 925 930 935			1435
CTC CGC ATC ATG CCA CAT TCT GGT GGG CGT GTT GGC AAG GGC ATC TAC Leu Arg Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr 940 945 950 955			1483
TTT GCC TCA GAG AAC AGC AAG TCA GCT GGA TAT GTT ATT GGC ATG AAG Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys 960 965 970			1531
TGT GGG GCC CAC CAT GTC GGC TAC ATG TTC CTG GGT GAG GTG GCC CTG Cys Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu 975 980 985			1579
GGC AGA GAG CAC CAT ATC AAC ACG GAC AAC CCC AGC TTG AAG AGC CCA Gly Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro 990 995 1000			1627
CCT CCT GGC TTC GAC AGT GTC ATT GCC CGA GGC CAC ACC GAG CCT GAT Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp			1675

00.12.05

1005	1010	1015	
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			
1020	1025	1030	1035
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			
	1040	1045	1050
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			
	1055	1060	1065
TAC CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCCCGCC TGTCCCCCGG GGTCTTGCAA			1873
Tyr Leu Leu Glu Val His Leu *			
	1070	1075	
GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTTT			1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA			1993
<u>CTTATGCCTC</u> <u>CTAACTGAAA</u> TTTTGTATTC TTTGACACAT CTGCCCAGTC CCTCTCCTCC			2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGGTTCC			2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTGTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT			2173
AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTTTCAT AAATGACAAG ATTTCCTCCT TTAAAAAAA			2233
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA			2265

(2) SEQ ID NO : 6 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 541 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 6:

00:12:05

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

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

00.12.05

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
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

(2) SEQ ID NO: 7 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1740 碱基对

(B) 种类: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假说: 非

(iv) 反义: 非

(vi) 来源:

(F) 组织类型: 骨骼肌

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) LAGE: 112..1710

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 7:

00-12-05

CCCGGCTTTC	ACTTTTTCTG	CTGCCTCGGG	GAACACCTCG	AGCCAACTGC	TTCCTAACTC	60
AGGGTGGGCA	GAAGTGACGG	GATCTAAGCT	TCTGCATCTC	TGAGGAGAAC	C ATG GCT	117
					Met Ala	
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						
545		550		555		

00.12.05

CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG GCT CTC Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu 560 565 570 575	213
AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC TCA TGT Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys 580 585 590	261
CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT GAC TGT Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys 595 600 605	309
ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC TAT ATT Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile 610 615 620	357
ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT CGC TGG Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp 625 630 635	405
GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC ACC TGC Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys 640 645 650 655	453
CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG AAG ACT Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr 660 665 670	501
AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC AAC AAG Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys 675 680 685	549
TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG GCT GTA Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu Ala Val 690 695 700	597
GTG AAG GCC TTA TCT CCC CAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG Val Lys Ala Leu Ser Pro Gln Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val 705 710 715	645
GTC AAG CCC TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC Val Lys Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn 720 725 730 735	693
ATC TTC AGC AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu 740 745 750	741
GAT GTG AAG AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala 755 760 765	789
CGT GGC TTC GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro 770 775 780	837
ACA GGG GAT GGC CAG AGC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT Thr Gly Asp Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr 885	885

785	790	795	
GTC ATC CCA CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC Val Ile Pro His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser 800 805 810 815			933
CCT GAT GTG CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC Pro Asp Val Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp 820 825 830			981
ATC GAG TTG GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG Ile Glu Leu Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu 835 840 845			1029
AAA GTG GAA GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC Lys Val Glu Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu 850 855 860			1077
AGG TGC CAG CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA Arg Cys Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala 865 870 875			1125
ATA CAG ACC TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC Ile Gln Thr Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn 880 885 890 895			1173
CTG CGG CAT GTT TGG AAA GTG AAC CGA GAA GGG GAG GGA GAC AGG TTC Leu Arg His Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe 900 905 910			1221
CAG GCC CAC TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC Gln Ala His Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr 915 920 925			1269
AAT GTG GCC GTG GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG Asn Val Ala Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met 930 935 940			1317
CCA CAC TCG GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu 945 950 955			1365
AAC AGC AAG TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His 960 965 970 975			1413
CAG GTG GGC TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His 980 985 990			1461
CAC ATC ACC ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe 995 1000 1005			1509
GAC AGC GTC ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp 1010 1015 1020			1557
ATT GAA CTT GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG			1605

00.12.05

Ile	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Gln	Pro	Val	Val	Val	Pro	Gln	Gly	Pro		
1025						1030						1035					
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		
1040					1045					1050					1055		
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		
				1060					1065						1070		
ATT	CAC	CTC	TAAGCTGCTT	GCCCTCCCTA	GGTCCAAGCC												1740
Ile	His	Leu															

(2) SEQ ID NO : 8 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 533 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 8:

00.12.05

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 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

00.12.05

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		

00:12:05

```

                    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
```

(2) SEQ ID NO : 9 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 1587 碱基对

(B) 种类: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(iii) 假说: 非

(iv) 反义: 非

(vi) 来源:

(F) 组织类型: 骨骼肌

(ix) 特征:

(A) 名称/键: CDS

(B) LAGE: 1..1584

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 9:

00.12.05

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	
535 540 545	
CAG CGA CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG	96
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
550 555 560 565	
GCT CTC AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC	144
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
570 575 580	
TCA TGT CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT	192
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr	
585 590 595	
GAC TGT ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC	240
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe	
600 605 610	
TAT ATT ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT	288
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn	
615 620 625	
CGC TGG GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC	336
Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe	
630 635 640 645	

00.12.05

ACC TGC CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu 650 655 660	384
AAG ACT AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro 665 670 675	432
AAC AAG TAC ACA CTT ATA GAA GTC CAG GGA GAA GCA GAG AGC CAA GAG Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu 680 685 690	480
GCT GTA GTG AAG GTG GAC AGC GGC CCT GTG AGG ACC GTG GTC AAG CCC Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro 695 700 705	528
TGC TCC CTA GAC CCT GCC ACC CAG AAC CTT ATC ACC AAC ATC TTC AGC Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser 710 715 720 725	576
AAA GAG ATG TTC AAG AAC GCA ATG ACC CTC ATG AAC CTG GAT GTG AAG Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys 730 735 740	624
AAG ATG CCC TTG GGA AAG CTG ACC AAG CAG CAG ATT GCC CGT GGC TTC Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe 745 750 755	672
GAG GCC TTG GAA GCT CTA GAG GAG GCC ATG AAA AAC CCC ACA GGG GAT Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp 760 765 770	720
GGC CAG ACC CTG GAA GAG CTC TCC TCC TGC TTC TAC ACT GTC ATC CCA Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro 775 780 785	768
CAC AAC TTC GGC CGC AGC CGA CCC CCG CCC ATC AAC TCC CCT GAT GTG His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val 790 795 800 805	816
CTT CAG GCC AAG AAG GAC ATG CTG CTG GTG CTA GCG GAC ATC GAG TTG Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu 810 815 820	864
GCG CAG ACC TTG CAG GCA GCC CCT GGG GAG GAG GAG GAG AAA GTG GAA Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu 825 830 835	912
GAG GTG CCA CAC CCA CTG GAT CGA GAC TAC CAG CTC CTC AGG TGC CAG Glu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln 840 845 850	960
CTT CAA CTG CTG GAC TCC GGG GAG TCC GAG TAC AAG GCA ATA CAG ACC Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr 855 860 865	1008
TAC CTG AAA CAG ACT GGC AAC AGC TAC AGG TGC CCA AAC CTG CGG CAT Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995	1056

00.12.05

870	875	880	885	
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	890	895	900	
TCC AAA CTG GGC AAT CCG 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	905	910	915	
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	920	925	930	
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	935	940	945	
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	950	955	960	965
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	970	975	980	
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	985	990	995	
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	1000	1005	1010	
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	1015	1020	1025	
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	1030	1035	1040	1045
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	1050	1055	1060	
TAA				1587

(2) SEQ ID NO : 10 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 528 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 10:

00.12.05

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys

00.12.05

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
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
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
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
Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr			

00.12.05

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		
395	390	395
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
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

(2) SEQ ID NO: 11 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 2

(D) SONSTIGE ANGABEN : /注释 = “ Xaa 代表
1 至 5 个其他氨基酸”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE : 3

(D) SONSTIGE ANGABEN : /注释 = “ Xaa 代表
Ser 或 Thr”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 11 :

Pro	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala
1				5					10				

(2) SEQ ID NO : 12 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE : 1

(D) SONSTIGE ANGABEN : /注释 = “ Xaa 代表
Ser 或 Thr”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE : 6

(D) SONSTIGE ANGABEN : /注释 = “ Xaa 代表
Ile 或 Val”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE : 9

(D) SONSTIGE ANGABEN : /注释 = “ Xaa 代表
1 至 5 个其他氨基酸”

(ix) 特征:

00.12.05

- (A) 名称/键: 区段
(B) LAGE: 10
(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Ser 或 Thr ”
(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 12:

Xaa	Xaa	Gly	Leu	Arg	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Lys
1				5				10						15	
Gly Ile Tyr Phe Ala															
20															

(2) SEQ ID NO: 13 描述:

- (i) 序列特征:
(A) 长度: 45 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑: 线性
(ii) 分子类型: 肽
(iii) 假说: 是
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 区段
(B) LAGE: 16
(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Ser 或 Thr ”
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 区段
(B) LAGE: 21
(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Ile 或 Val ”
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 区段
(B) LAGE: 24
(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 1 至 5 个其他氨基酸 ”
(ix) 特征:
(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 25

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Ser 或 Thr ”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 6

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Ser 或 Thr ”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 13:

```

Leu Leu Trp His Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Leu Xaa
1                               10                      15
Xaa Gly Leu Arg Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Lys Gly
20                      25                      30
Ile Tyr Phe Ala Xaa Xaa Xaa Ser Lys Ser Ala Xaa Tyr
35                      40                      45

```

(2) SEQ ID NO: 14 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 22 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 1

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Leu 或 Val ”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 14:

00.12.05

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 20

(2) SEQ ID NO: 15 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 21

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 Asp 或 Glu ”

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 22

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表 10 或 11 个其他氨基酸 ”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 15:

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Gln Leu Leu Xaa Xaa Xaa Trp Gly Arg Val Gly
 20 25

(2) SEQ ID NO: 16 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

00.12.05

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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
```

(2) SEQ ID NO: 17 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 44 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 4

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表
Ile 或 Leu ”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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
```

(2) SEQ ID NO: 18 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 15 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 18:

```

Phe Tyr Thr Xaa Ile Pro His Xaa Phe Gly Xaa Xaa Xaa Pro Pro
1           5           10           15

```

(2) SEQ ID NO: 19 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 19:

```

Lys Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Asp Ile Glu Xaa Ala Xaa Xaa
1           5           10           15

```

Leu

(2) SEQ ID NO: 20 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 11 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 20:

```

Gly Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Glu Val Ala Leu Gly
1           5           10

```

(2) SEQ ID NO: 21 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 14

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表
7 至 9 个其他氨基酸”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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
```

(2) SEQ ID NO: 22 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 区段

(B) LAGE: 2

(D) SONSTIGE ANGABEN: /注释 = “ Xaa 代表
Tyr 或 Phe ”

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 22:

```
Glu Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Leu Leu
 1           5           10           15
```

(2) SEQ ID NO: 23 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 非

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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

```

(2) SEQ ID NO: 24 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 非

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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

```

(2) SEQ ID NO: 25 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 21 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 非

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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

```

(2) SEQ ID NO: 26 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 非

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 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

```

(2) SEQ ID NO: 27 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 非

(xi) 序列特征: SEQ ID NO: 27:

00.12.05

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

Ala Leu Lys

(2) SEQ ID NO : 28 描述:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 是

(xi) 序列特征: SEQ ID NO : 28:

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

Ala Met Lys

说明书附图

1	MAESSDKLYRVEYAKSERASCKKCKSESIPKDSLRRAIHVQSPHFQKVPFWKVV	10	20	30	40	50	60	多数
1	MAAR							人 PARP1
1	HS							人 PARP2
1	M							人 PARP3
								鼠 PARP
61	GHSIRIPDVEVDGFSSELRRWDDQOKVKKKTAEAGGVTKGQDQGGIGSKAEKTLQDFAAEYAKS	70	80	90	100	110	120	多数
5								人 PARP1
3								人 PARP2
2								人 PARP3
								鼠 PARP
121	HRSTCKGCHEKIEKGGQVRLSKKHVDPEKPKQLGHIDRWYHUPQCFCVKNREELGFRPEYSASQ	130	140	150	160	170	180	多数
20								人 PARP1
3								人 PARP2
2								人 PARP3
								鼠 PARP
181	LKQFSLLATETDKELKXKQLPOVKSEGGKRRKQDKVDGVDEVAKKKSKKKEKDKQSKLEKALKKA	190	200	210	220	230	240	多数
43								人 PARP1
3								人 PARP2
2								人 PARP3
								鼠 PARP
241	QNDLIWNIKDELKKKVCSTNBDLKEILLIPNKKQVPSQGESAILLDRVADQHVFGALLPCEECSSG	250	260	270	280	290	300	多数
68								人 PARP1
3								人 PARP2
2								人 PARP3
								鼠 PARP

图 1(1)

R I A P H E A P - S G G R V O K O I Y P A S B N S K S A Q Y V V X T S X C O G H X V O L M L L O E V A L O X E H E L X X A 多数

910	920	930	940	950	960
-----	-----	-----	-----	-----	-----

878	R	I	A	P	P	E	A	P	V	T	G	Y	H	F	G	K	G	I	Y	P	A	D	H	V	S	K	S	A	N	Y	C	H	T	S	Q	-	G	D	P	I	O	L	I	L	L	G	E	V	A	L	G	O	N	H	Y	E	L	K	H	A	人	P	A	R	P	1
431	R	I	A	P	P	E	A	P	I	T	O	Y	H	F	G	K	G	I	Y	P	A	D	H	S	S	K	S	A	N	Y	C	P	A	S	R	-	L	K	N	T	O	L	L	L	L	E	V	A	L	G	O	C	N	E	L	E	A	人	P	A	R	P	2			
407	R	I	M	P	H	-	-	-	-	9	G	R	V	G	K	G	I	Y	P	A	S	B	N	S	K	S	A	G	Y	I	V	I	G	N	K	C	G	A	H	H	V	O	Y	H	F	L	O	E	V	A	L	G	R	E	N	H	I	N	T	D	人	P	A	R	P	3
400	R	I	N	P	H	-	-	-	-	S	G	R	V	G	K	G	I	Y	F	A	S	B	H	S	K	S	A	G	Y	I	V	T	I	H	H	C	G	H	O	V	Q	Y	N	F	L	O	E	V	A	L	G	K	E	H	I	I	D	人	P	A	R	P	4			

NP SL K SL P P G K D S V I G L G K T E P D P A Q D I E L D Q Q O V V V P L O P P V V X C Q X F X S S X P 9 L - Y S 多数

1020	1010	990	980	970
------	------	-----	-----	-----

936	SII SX - L PKG KH SV KGL GKT T PDPSANISLD	- - - QVDVPLQTQISSOV - - NDTSLLYN	PARP1
489	NPKAEG L LOG KH ST KQL GKMA PSSANPVT LN - - GSTVPLGPASD TGILNP DGY TLNYN	- - - - -	PARP2
461	NPSLKS PP GPDSV IARGHT EDPPTODTELE LDGQQVVVPVPPQGQPVPCEFSSTFSSQ - - S	- - - - -	PARP3
		- - - - -	PARP4

F Y I V V Y X F S O V R L R Y L L E V H P N P - X X L W -

0901 1030

988 EYIVYDI AQVRLKYLKXPNFKTSLW.
545 EYIVYNPNQVHRYYLLKVQPNF-LQLW.
521 EYLIYQESQCRLLRYYLLLEVHL.
514 EYLIYKESQCRLLRYYLLLEIH- - -L

多数

人 PARP1
人 PARP2
人 PARP3
鼠 PARP

图 1(4)

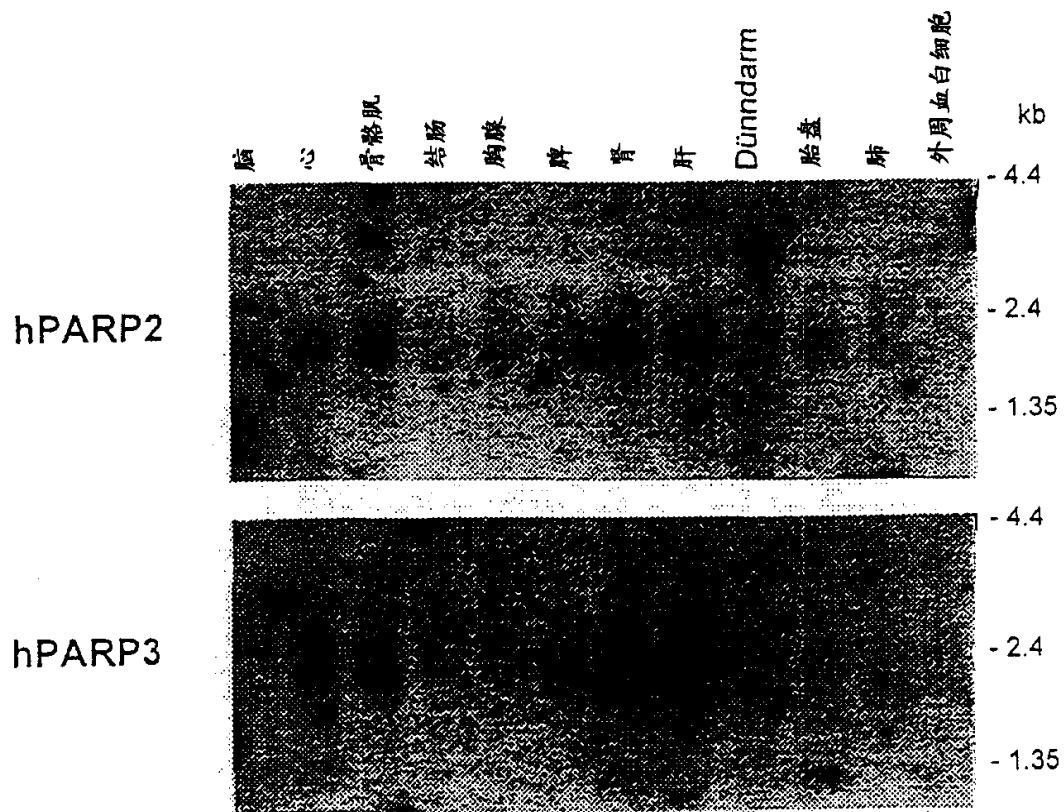


图 2

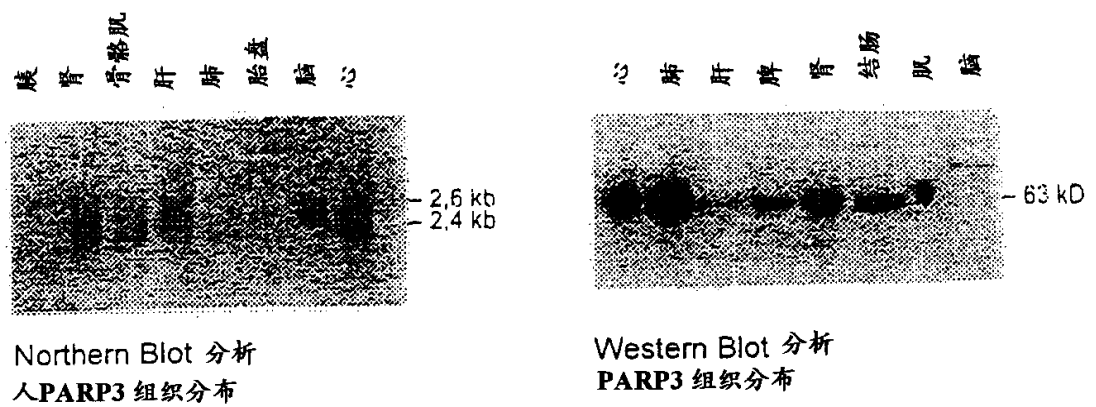


图 3

图 4

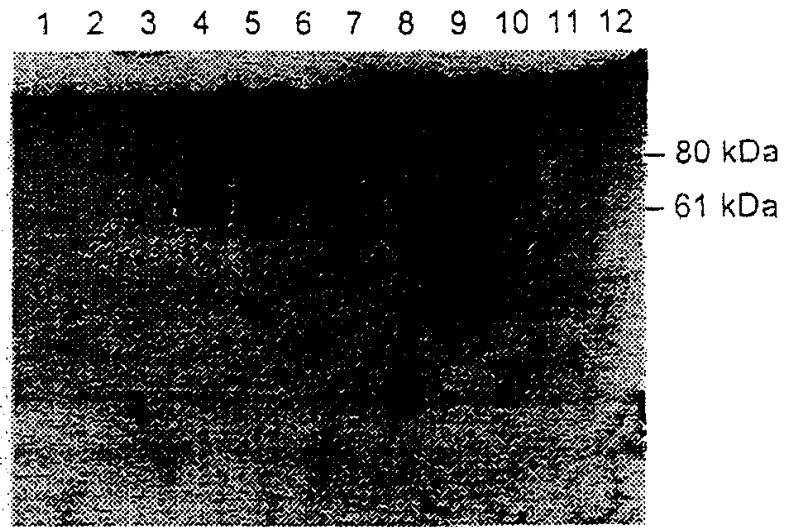
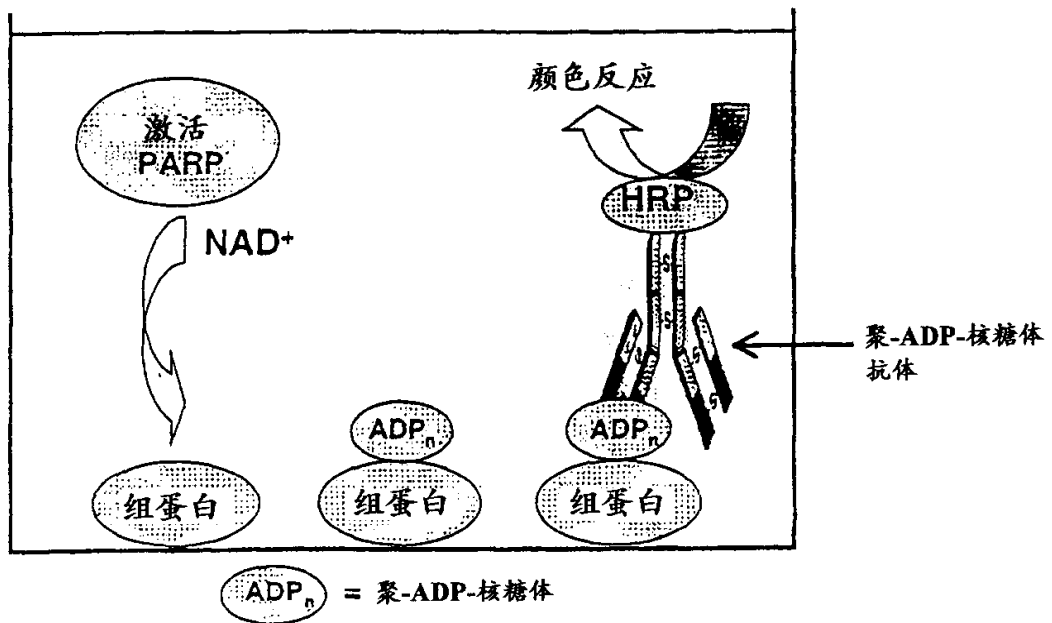


图 5



HRP = 辣根过氧化物酶

图 6

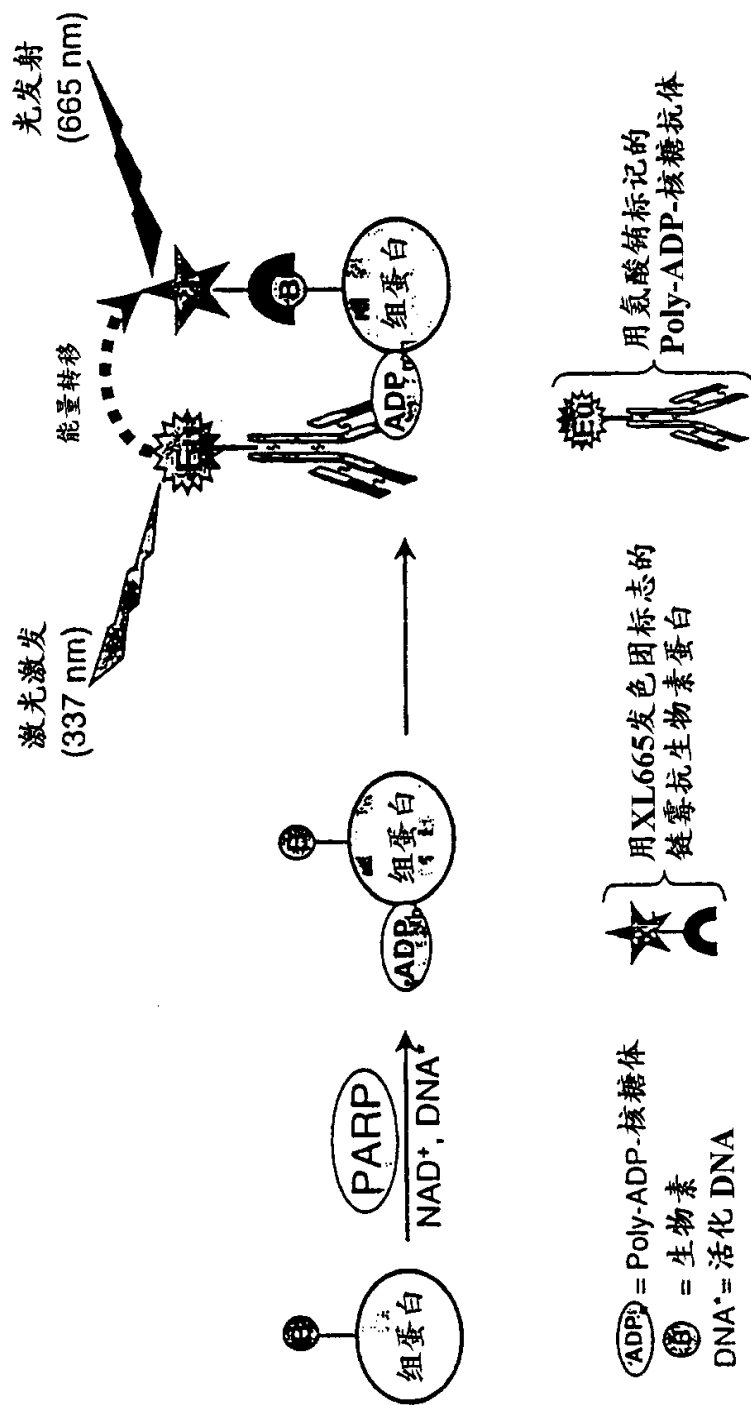


图 7