[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12N 15/12
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 5/20

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96193333.X

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1222617C

[22] 申请日 1996.12.20 [21] 申请号 96193333.X
[30] 优先权
[32] 1995.12.20 [33] US [31] 08/575,967
[32] 1996. 6. 7 [33] US [31] 08/661,393
[86] 国际申请 PCT/US1996/020759 1996.12.20
[87] 国际公布 WO1997/022698 英 1997.6.26
[85] 进入国家阶段日期 1997.10.17
[71] 专利权人 艾科斯有限公司
地址 美国华盛顿州
[72] 发明人 P·W·格雷 V·L·施维卡尔特
C·J·拉波尔特
审查员 李 博

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 卢新华 温宏艳

权利要求书 3 页 说明书 50 页

[54] 发明名称 趋化因子受体 88 - 2B [CKR - 3] 和 88C 及其抗体

[57] 摘要

本发明提供编码趋化因子受体 88 - 2B 或 88C 的多核苷酸，并提供重组生产这两种细胞因子受体的材料和方法。 本发明还提供用这两种多核苷酸方便地鉴别趋化因子受体配体和调节因子的试验方法。 受体片断、配体、调节因子和抗体可用于检测和治疗与趋化因子受体相关的疾病，如动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、肿瘤生长抑制、哮喘、病毒感染、艾滋病及其它炎症情况。

ISSN1008-4274

1.一种编码列于 SEQ ID NO:2 的趋化因子受体 88C 的氨基酸序列的纯化的和分离的多核苷酸。

2.权利要求 1 的多核苷酸，其中多核苷酸是 DNA。

3.权利要求 2 的多核苷酸，其中多核苷酸是基因组 DNA。

4.权利要求 2 的多核苷酸，其中多核苷酸是 cDNA。

5.权利要求 1 的多核苷酸，该多核苷酸为完全或部分化学合成的 DNA。

6.权利要求 2 的多核苷酸的 RNA 转录物。

7.权利要求 4 的多核苷酸，其中所述 cDNA 包含 SEQ ID NO:1 的 DNA。

8.一种含有权利要求 2 的多核苷酸并具有生物功能的 DNA 载体。

9.权利要求 8 的载体，其中所说的多核苷酸经基因操作与一段 DNA 表达调控序列相连。

10.一种稳定转化或转染了权利要求 2 的多核苷酸并能表达所说的多核苷酸的宿主细胞。

11.一种产生 88C 多肽的方法，该方法的步骤包括使权利要求 10 的宿主细胞在合适的营养培养基中生长并从所说的细胞或培养基中分离所说的多肽。

12.一种编码 88C 多肽的多核苷酸，所说的多核苷酸能在严格的杂交环境下与 SEQ ID NO:1 的多核苷酸杂交。

13.一种包含 SEQ ID NO:2 中列出的趋化因子受体 88C 的氨基酸序列的纯化的和分离的多肽。

14.一种特异性结合含有 SEQ ID NO:2 列出的 88C 氨基酸序列的多肽的抗体产物。

15.一种编码列于 SEQ ID NO:20 的恒河猴趋化因子受体 88C 的氨基酸序列的纯化的和分离的多核苷酸。

16.权利要求 15 的多核苷酸，其中多核苷酸是 DNA。

17.权利要求 16 的多核苷酸，其中多核苷酸是基因组 DNA。

18.权利要求 16 的多核苷酸，其中多核苷酸是 cDNA。

19.权利要求 15 的多核苷酸，该多核苷酸为完全或部分化学合成的 DNA。

20.权利要求 16 的多核苷酸的 RNA 转录物。

21.权利要求 18 的多核苷酸，其中所述 cDNA 包含 SEQ ID NO:1 的

DNA。

22.一种含有权利要求 16 的多核苷酸并具有生物功能的 DNA 载体。

23.权利要求 22 的载体，其中所说的多核苷酸经基因操作与一段 DNA 表达调控序列相连。

24.一种稳定转化或转染了权利要求 16 的多核苷酸并能表达所说的多核苷酸的宿主细胞。

25.一种产生恒河猴 88C 多肽的方法，该方法的步骤包括使权利要求 24 的宿主细胞在合适的营养培养基中生长并从所说的细胞或培养基中分离所说的多肽。

26.一种编码 88C 多肽的多核苷酸，其中所说的多核苷酸能在严格的杂交环境下与 SEQ ID NO:19 的多核苷酸杂交。

27.一种包含 SEQ ID NO:20 中列出的恒河猴趋化因子受体 88C 的氨基酸序列的纯化的和分离的多肽。

28.一种特异性结合含有 SEQ ID NO:20 列出的 88C 氨基酸序列的多肽的抗体产物。

29. 筛选 HIV 感染调节剂的方法，包括以下步骤:

a) 在一种化合物存在和不存在的情况下，让含有人或恒河猴 88C 受体的第一组合物与含有人类免疫缺损病毒包膜蛋白的第二组合物接触;

b) 测定人或恒河猴 88C 受体与 HIV 包膜蛋白在化合物存在和不存在的情况下的相互作用; 并且

c) 筛选 HIV 感染调节剂，其中与不存在化合物时相比存在化合物时人或恒河猴 88C 受体与 HIV 的相互作用下降或增加表示该化合物是 HIV 感染的调节剂。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述人或恒河猴 88C 受体包括具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的人 88C。

31. 权利要求 29 或 30 的方法，其中第一组合物包括一种已经过重组修饰的细胞，该细胞在表面表达人或恒河猴 88C 受体。

32. 权利要求 29－31 任一项的方法，其中第二组合物包括人类免疫缺损病毒。

33. 权利要求 29－32 任一项的方法，其中测定步骤包括测定细胞的 HIV 感染。

34. 检测细胞的 HIV 感染的方法，包括以下步骤:

a) 让 HIV 与经重组修饰的细胞接触，所述细胞表达人趋化因子受体 88C; 并且

b) 检测细胞的 HIV 感染。

35. 权利要求 14 或 28 的抗体在制备用于治疗 HIV 感染和 HIV 相关疾病状态的药物中的用途。

趋化因子受体 88-2B[CKR-3]和 88C 及其抗体

本申请是 1996 年 7 月 7 日提交的美国专利申请 NO.08/661,393 的部分延续，而该美国专利申请是 1995 年 12 月 20 日提交的美国专利申请 NO.08/575,967 的部分延续。

发明领域

本发明总的来讲涉及信号传导途径。具体地讲，本发明涉及趋化因子受体、编码趋化因子受体的核酸、趋化因子受体的配体、趋化因子受体活性的调节因子、识别趋化因子和趋化因子受体的抗体、鉴别趋化因子受体配体和调节因子的方法、生产趋化因子受体的方法以及生产鉴别趋化因子受体的抗体的方法。

发明背景

最近，分子生物学的进展使人们认识到信号传导途径在生物过程中的中心地位。这些信号传导途径组成了多细胞机体中单个细胞之间相互传递信息的主要手段，机体籍此协调各种生物过程。见 Springer，《细胞》(Cell)，76：306-314（1994），表 I 为一个模型。一条因有细胞内鸟嘌呤结合蛋白的参与而以之命名的信号传导途径，影响着广泛的生物过程。

Lewin 对 G-蛋白信号传导途径进行了概括性的讨论[《基因》(Gene),V 319-348(1994)]，他认为 G-蛋白信号传导途径至少含有以下成分：一个细胞外信号（如神经递质、肽类激素、有机分子、光和气味分子）、一个信号识别受体（G-蛋白偶联受体，见 Probst 等综述，《DNA 和细胞生物学》(DNA and Cell Biology)，11:1-20 [1992]，即通常所说的 GPR 和 GPCR）以及一个细胞内 GTP-结合蛋白即 G 蛋白的异源三聚体。这些信号传导途径因在白细胞迁移中所起的作用而尤其引人注目。

白细胞包含一组具有迁移能力的血细胞类型，这些血细胞类型包括粒细胞（即嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞）、淋巴细胞和单核细胞。在迁移和活化后，这些细胞主要参与机体对异物的防御。由于其参与正常生理过程和病理过程的多样性，白细胞的防御作用非常复杂，例如白细胞在应答感染的正常炎症反应中起作用，但也参与多种

病理性炎症．详见 Schall 等，《现代免疫评论》(Curr. Opinion. Immunol)，6:865-873(1994)．在不同的生物过程中，每种白细胞所起作用的程度、种类、持续时间都各不相同．

在研究这些免疫反应时，研究者们最初的注意力主要集中在作用于白细胞的信号上，这是因为任何种类应答的诱导都需要一个信号．Murphy 对一类重要的白细胞信号一多肽信号的成员进行了综述[《免疫学年度综述》(Ann.Rev.Immunol.),12:593-633 (1994)]．有一类多肽信号包含趋化因子（化学吸引细胞因子），Oppenheim 等人称之为 Intercrine[《免疫学年度综述》(Ann.Rev.Innunol.),9:617-648(1991).]．除 Oppenheim 等人外，Baggiolini 等人还列出了数目不断增加的已经鉴定和进行遗传学及生物化学分析的趋化因子[《免疫学进展》(Advances in Immunol.) 55:97-179(1994)]．

通过比较已知趋化因子的氨基酸顺序得到一种分类方法，可将趋化因子分为两个家族：α 家族趋化因子的特征是头两个胱氨酸残基被一个氨基酸残基间隔开（CXC，指 N-末端）；而在β 家族中这两个胱氨酸残基则直接相连（CC），见上文 Baggiolini 等．已经发现了趋化因子与对其信号产生应答的特定白细胞类型之间的关系．Schall 等人（见上文）报导说：CXC 趋化因子一般影响嗜中性粒细胞；而 CC 趋化因子倾向于影响单核细胞、淋巴细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞．例如 Baggiolini 等人（见上文）报导：RANTES（一种 CC 族趋化因子）可作为单核细胞、淋巴细胞（即记忆 T 细胞）、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的化学吸引剂，并诱导嗜碱性粒细胞中组胺的释放，但不能对嗜中性粒细胞产生趋化作用．

最近，Cocchi 等人报导：趋化因子是 HIV 增殖的抑制剂[Cocchi 等,《科学》(Science), 270:1811-1815(1995)]．他们证明：RANTES、MIP-1α 和 MIP-1β 能抑制 HIV-1、HIV-2 和 SIV 在一种名为 PM1 的 $CD4^+$细胞系和人外周血单核细胞原代培养物中的感染．

然而最近研究重点已转向结合趋化因子的细胞受体，因为细胞外的趋化因子看起来不加区别地与细胞接触，因而缺乏调节单个白细胞种类所需的特异性．

Murphy（见上文）报导，GPCR 受体超家族包含趋化因子受体家族．典型的趋化因子受体结构包括：一个位于 N-末端的胞外趋化因子结

合区域；接着是七个被间隔开的疏水区域，这种疏水区域主要由能形成跨膜α-螺旋的疏水氨基酸组成；亲水区域位于α-螺旋之间，它们或在细胞内或在细胞外。这些特征使嵌于膜上的趋化因子受体呈螺旋状结构。趋化因子受体通常以胞内区的第三环与 G-蛋白作用。另外， Murphy（见上文）还指出，胞内的羧基末端也能与 G-蛋白作用。

首先用分子克隆技术获得分析的趋化因子受体是两个人 IL-8 的嗜中性粒细胞受体， IL-8 为一种 CXC 趋化因子。 Homels 等人[《科学》(Science)253:178-1280(1991)]Mur 等人[《科学》(Science)253:1280-1283(1991)]报导克隆了这两个 IL-8 的受体。 Lee 等人[《生物与化学杂志》(J.Biol.Chem.)267:16283-16287(1992)]对编码这两个受体的 cDNA 进行了分析，发现它们之间有 77%的氨基酸相同并都具有 G-蛋白偶联受体家族的特征。其中一个受体是 IL-8 特异性的，而另一个可与 IL-8 、gro/MGSA 、和 NAP-2 结合并传导信号。对 IL-8 受体基因进行的基因操作增进了我们对这些受体生物学作用的了解。例如， Cacalano 等人[《科学》(Science)265:682-684(1994)]报导：小鼠中 IL-8 受体同系物的缺失将导致淋巴结病和脾大等多种表型的出现。另外， Leong 等人[《生物与化学杂志》(J.Biol.Chem.) 269:19343-19348(1994)]对错义突变所做的一项研究揭示了 IL-8 受体中与 IL-8 结合至关重要的氨基酸。 Murphy （见上文）对结构域置换实验所做的讨论暗示：胞外氨基末端结构域决定了结合的特异性。

CC 族趋化因子中也已有数个受体得到鉴定和克隆， CCCKR1 可与 MIP-1α 和 RANTES 结合并都导致钙离子内流。 Charo 等人[《美国国家科学院院报》(Pro.Natl.Acad.Sci.)(USA)91:2752-2756(1994)]报导了另一个趋化因子受体— MCP-R1 （ CCCKR2 ）， MCP-R1 由单一基因编码但可产生两种剪接变体，这两种剪接变体的差异位于羧基端结构域，这种受体除可与 MCP-1 结合和产生应答外，还可与 MCP-3 结合并产生应答。

还发现了一个能不加区别地与 CXC 趋化因子和 CC 趋化因子结合的受体。这种受体最初是在红细胞上发现的， Horuk 等人[《科学》(Science) 261:1182-1184(1993)]报导它可与 IL-8 、 NAP-2 、 GROα 、RANTES 、和 MCP-1 结合。这种红细胞趋化因子受体与其它趋化因子受体有大约 25%的同源性，可帮助调节循环中趋化因子的水平或协助将

趋化因子呈递给靶细胞．除与趋化因子结合外，红细胞趋化因子受体还可作为间日疟原虫的受体，这种疟原虫是疟疾(id)的一个主要原因．另一个与趋化因子受体关系密切的 G-蛋白偶联受体一血小板活化因子受体也可作为人类病原体（肺炎链球菌）的受体[Cundell 等，《自然》(Nature)377:435-438(1995)].

除哺乳动物的趋化因子受体外，还发现了两种病毒的趋化因子受体同系物.Ahuja 等人[《生物与化学杂志》(J.Biol.Chem.)268:20691-20694(1993)]报导了 Herpesvirus saimiri 的一个基因产物，该产物与 IL-8 受体有 30%的同源性并能与 CXC 族趋化因子结合． Neote 等人[《细胞》(Cell),72:415-425(1993)]报导人巨细胞病毒的一个基因可编码与 CC 族趋化因子受体有大约 30%同源性的受体，该受体可与 MIP-1α 、MIP-1β 、 MCP-1 和 RANTES 结合．这些病毒受体能影响趋化因子的正常功能，从而使病毒获得选择性的病理优势。

由于趋化因子种类繁多活性多样，趋化因子受体的种类也非常多，已鉴定的受体仅占趋化因子总体的一部分。因此在本领域中仍需鉴定更多的趋化因子受体。应用这些新受体可为我们发展趋化因子和趋化因子受体的治疗用调节剂提供手段，本发明期望这样的调节剂可作为药物用于动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、肿瘤生长抑制、哮喘、病毒感染和其它炎症情况的治疗。另外，趋化因子受体的片断或变异体或识别这些受体的抗体也可望成为药物。

发明概述

本发明提供分离和纯化的核酸，这些核酸编码参与白细胞迁移的趋化因子受体，本发明的多核苷酸（包括有义链和反义链）包括基因组 DNA 、 cDNA 、 RNA 以及完全或部分人工合成的核酸。优选的多核苷酸包括：编码趋化因子受体 88-2B 的 DNA，该 DNA 的序列在 SEQ ID NO:3 中列出；编码趋化因子受体 88C 的 DNA，该 DNA 的序列在 SEQ ID NO:1 中列出；以及能与上述 DNA 在标准的严格杂交环境下杂交的 DNA 或只与上述 DNA 遗传密码的冗余部分之外的序列杂交的 DNA 。典型的严格杂交条件包括：杂交反应的温度为 42°C；杂交缓冲液为 50%甲酰铵、 5XSSC 、 20mM 磷酸钠、 pH6.8 ； 洗脱在 0.2XSSC 中进行，洗脱温度为 55°C 。本领域的技术人员都知道上述杂交条件可根据待杂交 DNA 的长度和 GC 含量作适当调整．本领域的标准公式可以用于确

定精确的杂交条件．见 Sambrook 等，§§ 9.47-9.51,《分子克隆实验手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual), Cold Sring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)．本发明还涉及编码 88-2B 或 88C 各结构域的多核苷酸，例如编码一个或多个这两种蛋白质的胞外结构域或其它生物活性片断的多核苷酸．88-2B 的胞外结构域对应于 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的 1-36、93-107、171-196 和 263-268 位氨基酸残基，这些胞外结构域由对应于 SEQ ID NO:3 的 362-469、638-682、872-949 和 1148-1213 位核苷酸的多核苷酸序列编码。88C 的胞外结构域对应于SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的 1-32、89-112、166-191 和 259-280 位氨基酸残基，由对应于 SEQ ID NO:1 的 55-150、319-390、550-627 和 829-894 位核苷酸的多核苷酸序列编码。本发明还包括编码这两种细胞受体胞内结构域的多核苷酸序列。88-2B 的胞内结构域包括 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 中的 60-71、131-151、219-240 和 306-355 位氨基酸残基，它们分别由对应于 SEQ ID NO:3 的 539-574、752-814、1016-1081 和 1277-1426 位核苷酸的多核苷酸序列编码。88C 的胞内结构域包括 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中的 56-67、125-145、213-235 和 301-352 位氨基酸残基，这些结构域分别由对应于 SEQ ID NO:1 的 220-255、427-489、691-759 和 955-1110 位核苷酸的多核苷酸序列编码．相当于一个或多个胞内和胞外结构域的多肽链或这些多肽链的特异性抗体，都可以用作受体活性尤其是与配体和 G-蛋白结合活性的调节剂．

本发明的核苷酸序列还可用来制备寡核苷酸标记探针，用于在严格杂交条件下分离编码 88-2B 和 88C 的基因组 DNA（即用 Southern 分析和聚合酶链反应的方法）。这些寡核苷酸探针还可用于检查编码 88-2B 和 88C 基因的特殊等位基因，使特殊等位基因相关疾病的诊断和基因治疗变得方便易行．另外，这些寡核苷酸探针还可用于改变趋化因子受体的遗传，以利于趋化因子受体调节剂的鉴定．本发明的核苷酸序列也可用来设计反义核酸元件，用于探索和改变 88-2B 和 88C 的遗传和表达．本发明还包括上述 DNA 的生物复制子（即体内或体外分离的 DNA 拷贝）和 RNA 转录物．本发明还提供有效整合 88-2B 和 88C 多核苷酸并能自主复制的重组结构如：质粒、病毒、染色体载体（如 YAC）。而且，本发明还特别提供一类载体，在这种载体上，有效编码 88-2B 和 88C

的 DNA 序列与一个或多个内源或异源表达控制序列相连。

88-2B 和 88C 受体可从自然产物、重组产物和人工合成产物中获得。可以用本发明的多核苷酸按标准方法转化或转染宿主细胞（原核细胞和真核细胞）来表达趋化因子受体 88-2B 或 88C。除完整的 88-2B 或 88C 基因产物外，本发明还涉及这两个蛋白的生物活性片断、类似物以及根据它们的氨基酸顺序人工合成的多肽，88-2B 或 88C 的氨基酸序列分别见 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:2。当用真核细胞生产时，88-2B 或 88C 的基因产物或其生物活性片断还可获得翻译后修饰（例如：二硫键形成、糖基化、磷酸化、豆蔻酰化、棕榈酰化、乙酰化等）。本发明进一步涉及 88-2B 和 88C 的基因产物或其生物活性片断的单体、同源多聚体和异源多聚体。

本发明的一个方面特别地包括能与 88-2B 和 88C 趋化因子受体特异性结合的抗体。这种抗体可用重组的 88-2B 或 88C 受体、88-2B 或 88C 受体的合成肽或肽片断、表达于宿主细胞表面的 88-2B 或 88C 以及从天然来源纯化的 88-2B 或 88C 受体作抗原按本领域的标准方法进行制备。这些抗体包括任何来源任何亚型的单克隆抗体和多克隆抗体。同时，本发明也包括抗体的单体、同源多聚体、异源多聚体以及它们的片断。本发明还进一步包含 CDR-嵌合抗体、“人源化”抗体、以及其它仍保留与趋化因子受体特异性结合能力的抗体修饰产物。

本发明还包含使用这些抗体来检测 88-2B 或 88C 的基因产物、类似物或生物活性片断。例如，抗体可用于揭示 88-2B 或 88C 的表达与多种正常或病理状态之间的关系。另外，抗体还可用来分析 88-2B 或 88C 的基因产物、同系物或生物活性片断表达的组织特异性差异。88-2B 和 88C 趋化因子受体的特异性抗体还可用作受体活性的调节剂。另一方面，88-2B 或 88C 受体的特异性抗体可用于治疗目的。

本发明还提供试验方法来分析能与本发明的趋化因子受体相互作用的配体。这些试验可以包括通过监测标记配体与受体结合直接检测趋化因子受体的活性等。另外，这些试验还可用来间接估计配体与趋化因子受体的相互作用。本文中“配体”一词包括 88-2B 或 88C 的激动剂分子和拮抗剂分子以及其它能与这两种受体结合的分子。

直接检测配体与趋化因子受体结合可用下面的试验方法进行。待测化合物（即假定的配体）先进行标记（如放射性同位素标记）。然后使

标记的待测化合物与带有本发明的趋化因子受体的膜制备物相接触。优选使用携带表达本发明的趋化因子受体的重组质粒的宿主细胞制备所用的膜。温育一段时间使膜上的趋化因子受体与标记的待测化合物充分接触，用真空抽滤将膜组分收集在滤膜上。然后测定滤膜上的标记物，例如可用液闪分光光度计来测定放射性标记物。使用这种技术可鉴定能与趋化因子受体结合的配体。为进一步证实该化合物为配体，可在有非标记待测化合物的情况下，将标记的待测化合物与携带趋化因子受体的膜制备物作用，并且非标记化合物的量不断增加。如果随着非标记化合物的量增加，滤膜上的标记物水平下降，就证明该化合物为一种配体。

激动剂和拮抗剂都是能与受体结合的配体，激动剂能引起细胞内的信号传导而拮抗剂不能。确定一种特定的配体究竟是激动剂还是拮抗剂，可以用诸如分析 G-蛋白偶联的信号传导途径的方法进行。G-蛋白偶联信号传导途径的激活可通过测量细胞内 Ca^{++}流动、磷脂酶 C 的活性、腺苷酸环化酶的活性以及其它试验来确定（见实施例 5 和实施例 6）。

如本文中各实施例中所详细讨论的那样，可与 88C 受体结合的趋化因子包括 RANTES、MIP-1α、MIP-1β；可与 88-2B 结合的趋化因子包括 RANTES。

另一个方面，本发明特别包括 88-2B 和 88C 受体与其配体相互作用的调节剂。趋化因子受体功能的调节剂可用类似鉴定配体的试验进行鉴定。将带有一种趋化因子受体的膜制备物与一种稳定的和已知量的标记配体进行作用，同时加入一种怀疑为该趋化因子受体活性调节剂的待测化合物，并且加入的量不断增加。如果滤膜上标记物的水平与加入的待测化合物的量有关，就说明这种化合物是趋化因子受体活性的调节剂。如果滤膜上标记物的水平随待测化合物的增加而升高，说明该化合物是一种激活剂；反之，如果如果滤膜上标记物的水平随待测化合物的增加而降低，说明该化合物是一种抑制剂。用这种方法检测受体结合活性的调节剂，可以对多种假定调节剂进行快速筛选，因为可以在同一个反应中，可以同时对含有多种潜在调节剂的混合物进行检测。

受体结合的间接试验包括测量相关信号传导途径中任何组分的浓度或活性水平。趋化因子受体的激活通常与细胞内 Ca^{++}流动相关。可以使表达趋化因子受体的细胞带有一种钙敏感染料，当其表达的受体被激

活时，就可用分光光度计通过染料观测到 Ca^{++}的流动，另外也可用显微镜进行观测。使用这两种方法中的任意一种，可在存在和不存在假定配体的条件下做平行试验。例如，使用显微镜法观测 Ca^{++}的流动，一个 CC 族趋化因子— RANTES 被确定为 88-2B 趋化因子受体的一个配体。本领域的研究人员将会认识到这些试验也可用于鉴定和监测受体活性调节剂的纯化。在这些试验中，激活剂和抑制剂分别激活和抑制受体与其配体的相互作用。

另外， 趋化因子受体与 G-蛋白的联系，使我们可以通过监测 G-蛋白的活性来估计受体的活性。 G-蛋白的一个特殊活性— GTP 水解活性可以使用诸如 ^{32}P 标记的 GTP 来进行监测。

G-蛋白还通过参与信号传导途径影响其它多种分子。例如， G-蛋白的效应分子包括: 腺苷酸环化酶、磷脂酶 C 、离子通道和磷酸二酯酶。当宿主细胞表达所感兴趣的趋化因子受体并与适当的配体作用时，可用针对上述任何效应分子的试验来监测配体结合所诱导的趋化因子受体活性。例如，有一种检测趋化因子受体活性的方法包含磷脂酶 C 的测定，在这一试验中，表达一种趋化因子受体的宿主细胞在存在激动剂时其放射性标记的磷酸肌醇产物得到测定。检测磷脂酶活性需要共转染一个编码外源 G-蛋白的 DNA 。当需要共转染时，这个试验可用嵌合的 G-蛋白 DNA 如 Gqi5[Conklin 等《自然》(Nature)363:274-276(1993)]与 88-2B 或 88C DNA 进行共转染，在存在 88-2B 和 88C 受体的一种激动剂时，测定磷酸肌醇的产量。本领域的技术人员会认识到这些针对 G-蛋白效应分子的试验同样能用于鉴定和监测受体活性调节剂的纯化。在这些试验中，受体激活剂和抑制剂分别激活和抑制受体与其配体的相互作用。

趋化因子与多种炎症疾病有关，如牛皮癣、关节炎、肺纤维变性和动脉粥样硬化（见上文 Baggiolini 等）。趋化因子活性的抑制剂可用于这些疾病的治疗。在一个实例中， Broaddus 等人[《免疫学杂志》(J.of Immunol.)152:2960-2967(1994)]介绍了 IL-8 的一种抗体，这种抗体能在兔肺急性炎症模型中抑制内毒素诱导胸膜炎的嗜中性粒细胞聚集。同样，能与 88C 受体结合的配体或能调节其活性的调节剂也可用于治疗艾滋病感染和艾滋病相关疾病。本发明所考虑的趋化因子与特异受体结合的调节剂可包括直接针对一种趋化因子或受体的抗体、生物或化学小分

子、以及对应于趋化因子或受体片断的合成肽.

本发明还包括对哺乳类受体给予含有 88-2B 和 88C 调节剂的组合物，用来监测和治疗正常或病理的免疫反应以及病毒感染，这些病毒感染包括逆转录病毒如 HIV-1 、 HIV-2 和 SIV 引起的感染。本发明还特别地包括通过给予药用可接受剂量的 88-2B 或 88C 受体调节剂来缓解炎症应答、造血异常和病毒感染。本发明进一步包括将上述活性物质与载剂、稀释剂或药剂组成可药用的组合物进行给药。本发明还包括多种给药途径。例如，活性物质可经下述途径给药：静脉、皮下、腹膜、肌内、口、肛门（即使用栓剂）、或肺（即通过吸入器、喷雾器和雾化器等）。

另一方面，依据本发明提供的 DNA 序列，可以在啮齿动物中运用同源重组或“基因剔除”策略，构建不能表达有功能的 88-2B 或 88C 趋化因子受体或表达突变受体的啮齿类动物。另外，运用众知的实验室技术还可构建表达克隆化 88-2B 或 88C 受体的转基因鼠[《小鼠胚胎操作指南》(Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual) Brigid Hohan, Frank Costantini 和 Elizabeth Lacy,编(1986)Cold Spring Harbor Laboratory ISBN 0-87969-175-I]。这些啮齿类动物可用作体内研究 88-2B 或 88C 受体活性的动物模型.

本领域的技术人员在研究下面各实施例时很容易发现本发明的其它内容和优点。

发明详述

本发明用下面各实施例进行说明。实施例 1 介绍编码 88-2B 和 88C 趋化因子受体的基因组 DNA 的分离方法；实施例 2 介绍编码人 88-2B 和 88C 以及恒河猴 88C 的 cDNA 的分离和测序过程；实施例 3 介绍用 Northern 分析来揭示在不同组织中 88-2B 和 88C 受体的表达图谱；实施例 4 详细说明了 88-2B 和 88C 受体的重组表达；实施例 5 介绍了用于检测与潜在配体应答后 88-2B 和 88C 受体活性的多种试验方法，包括 Ca^{++}流动试验(Ca^{++} Flux Assay)、磷酸肌醇水解试验和结合试验；实施例 6 和实施例 7 都是介绍 88-2B 和 88C 作为 HIV 的辅助受体所起作用的实验。实施例 8 介绍了能与 88C 进行免疫反应的单克隆抗体和多克隆抗体的制备方法和分析方法。实施例 9 介绍了用于鉴定 88-2B 或 88C 配体或调节剂的其它试验。

实施例 1

编码本发明的新趋化因子受体的基因组部分克隆由 PCR 方法获得. PCR 依据已鉴定趋化因子受体基因的保守序列和趋化因子受体基因在人基因组中成束分布进行设计. 基因组 DNA 按标准 PCR 方法以变性寡核苷酸片断作引物进行扩增.

PCR 扩增所用的模板来自商业化的人重组基因组 DNA，这种人基因组 DNA 克隆构建在酵母人工染色体（即 YAC ）上(Research Genetics,Inc.,Huntsville, AL, YAC Library Pools, catalog no.95011 B). 每个 YAC 载体可容纳 500-1000 个千碱基对的插入片断。首先，用 PCR 方法用针对编码 CCCKR1 的基因的特异引物对 YAC 克隆库进行筛选。其中，有义链引物 CCCKR(2)-5'(对应于 CCCKR1 的有义链)见 SEQ ID NO:15 ，其序列为 5'-CGTAAGCTTAGAGAAGCCGGGATGGGAA-3'，其中下面划线的核苷酸为 CCCKR1 的翻译起始密码子。反义链引物为 CCCKR-3'(对应于 CCCKR1 的反义链), 其序列见 SEQ ID NO:, CCCKR-3'的序列为 5'-GCCTCTAGAGTCAGAGACCAGCAGA-3', 其中含有 CCCKR1 翻译终止密码子的反向互补核苷酸（划线核苷酸）。可用合适的鉴定方案, 将能产生可察 PCR 产物(即凝胶电泳中出现 DNA 带）的 YAC 库鉴定为适宜的 YAC 亚库. （ Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). PCR 反应起始条件为 94°C 温育 4 分钟。序列扩增共采用 33 个循环, 每轮循环变性条件为 94°C、 1 分钟, 退火条件为 55°C、 1 分钟， 链延伸条件为 72°C 、 2 分钟.

所获得的 YAC 克隆亚库可用 PCR 方法进行第二轮筛选， PCR 所使用的条件和引物与第一轮相同. 从亚库中可筛选到能用 CCCKR1 的特异引物进行 PCR 反应的单个克隆。其中一个克隆—克隆 881F10 带有 640Kb 的人基因组 DNA， PCR 和杂交证实该基因组 DNA 来自 3p21 染色体并含有编码 CCCKR1 和 CCCKR2 的基因。一个重叠克隆 941A7 带有 700Kb 的人基因组 DNA , 也含有编码 CCCKR1 和 CCCKR2 的基因。接着对这两个 YAC 克隆进行进一步图谱分析， Southern 分析发现， CCCKR1 和 CCCKR2 之间仅相距约 100Kb 。

CCCKR1 和 CCCKR2 基因紧密靠近表明新的相关基因很可能也与它们相连。以 YAC 克隆 881F10 和 941A7 的 DNA 为模板，可用 PCR 方法扩增任何与 CCCKR1 和 CCCKR2 相连的受体基因。设计变性寡核

苷酸作为 PCR 引物，寡核苷酸序列对应于编码 CC 族趋化因子受体第二胞内环和第六跨膜结构域的基因区，这些基因区可通过比较 CCCKR1、CCCKR2 和 V28 的相应序列推导得出.使用 V28 是因为它是一个具有趋化因子受体特征的孤儿受体，V28 已被定位在人的 3 号染色体上[Raport 等,《基因》(Gene) 163:295-299(1995)]. 需进一步说明的是，CCCKR2 的两个剪接变体— CCCKR2A 和 CCCKR2B 对于所分析的第二胞内环和第六跨膜结构域来说是相同的。5'引物命名为 V28degf2，V28degf2 内部有一个 BamHI 酶切位点（见下文），其序列见 SEQ ID NO:5，引物 V28degf2 的序列与编码受体典型结构第二胞内环的 DNA 一致，（Probst 等，见上文）；3'引物命名为 V28degr2，V28degr2 内部有一个 HindIII 酶切位点（见下文），其序列见 SEQ ID NO:6，V28degr2 的序列与编码受体典型结构第六跨膜结构域的 DNA 一致。

PCR 扩增后的 DNA 随后用 BamHI 和 HindIII 消化，产生大小约 390bp 的 DNA 片断，这一数据与由典型序列所推测的片断大小一致。然后将消化后的 PCR 片断克隆到 pBluescript 上(Stratagene Inc., LaJolla, CA)。对所获得的 54 个克隆片断进行核酸自动测序分析，在这 54 个克隆中，除 CCCKR1 和 CCCKR2 的序列外，还找到本发明的两个新趋化因子受体基因的序列。这两个新趋化因子受体基因被命名为 88-2B 和 88C。

运用限制内切酶图谱技术和杂交技术测量了编码受体 88C、88-2B、CCCKR1 和 CCCKR2 的基因在图谱中的相对位置。这四种基因紧密相连，其中 88C 与 CCCKR2 都位于人染色体 3p21 上，相距仅约 18KBP。

实施例 2

88-2B 和 88C 的全长 cDNA 可按下述步骤从巨噬细胞 cDNA 文库中获得。首先，用人巨噬细胞 mRNA 在 pRc/CMV(Invitrogen Corp., San Diego, CA)中构建一个 cDNA 文库[见 Tjoelker 等,《自然》(Nature) 374:549-553(1995)]，然后用 88-2B 或 88C 的特异引物对在 cDNA 文库中 PCR 筛选含 88-2B 和 88C 的 cDNA 克隆。PCR 的起始变性条件为 94°C、4 分钟，扩增共进行 33 个循环。反应条件为：变性 94°C、1

分钟；退火 55°C 、 1 分钟；链延伸 72°C 、 2 分钟． 88-2B 的第一条特异引物为 88-2B-f1，其序列见 SEQ ID NO:11，它对应于 SEQ ID NO:3 中有义链的 844-863 核苷酸． 88-2B 的第二条特异引物为 88-2B-r1，其序列见 SEQ ID NO:12，它对应于 SEQ ID NO:3 中 1023-1042 核苷酸的反义链．与此类似， 88C 的第一条特异引物 88C-f1 的序列见 SEQ ID NO:13，它对应于 SEQ ID NO:1 中有义链的 453-471 核苷酸． 88C 的第二条特异引物为 88C-r3，其序列见 SEQ ID NO:14，它对应于 SEQ ID NO:1 中 744-763 核苷酸的反义链．

筛选得到了克隆 777，它是 88-2B 的一个 cDNA 克隆．克隆 777 含有一个 1915bp 的 DNA 插入片断，该插入片断包括 88-2B 的全部编码序列，这是根据以下标准确定的：这个克隆含有一个长的以 ATG 密码子为起点的开放阅读框，有一个 Kozak 序列，且在上游有一个框内终止密码子．克隆 777 中插入 DNA 的序列及由其推导出的氨基酸顺序分别见 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4． 88-2B 在巨噬细胞 cDNA 文库中的转录水平非常低，在估计总数为三百万的克隆中，只筛选到三个 88-2B 克隆。

在筛选编码 88C 趋化因子受体的 cDNA 克隆时找到两个克隆 101 和 134，这两个克隆看来都含有完整的 88C 编码区并有一个假定的起始密码子．但这两个克隆缺少必需的 5'辅助序列来证实其起始密码子． 88C 转录子在巨噬细胞 cDNA 文库中相对多一些，在筛库过程中，估计每 3000 个转录子（库总量约为三百万克隆）中就有一个 88C 转录子。

运用 RACE PCR （ cDNA 末端快速扩增）技术延伸已存在的 88C 克隆的序列，就可以方便地对 88C cDNA 的 5'末端进行精确的分析．人脾 5'-RACE-ready cDNA 购自 Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA 并按厂商推荐的方法使用．将 cDNA 制备成 5'-RACE-ready 的方法是将一段锚序列连接在 cDNA 片断的 5'端．这段锚序列与 Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA 提供的一个锚引物互补，这个锚序列-锚引物多核苷酸双链中有一个 EcoRI 酶切位点．选用人脾 cDNA 为模板的原因是 Northern 杂交表明 88C 能在脾中表达． PCR 反应的起始步骤是将样品 94°C 变性 4 分钟，然后进行 35 轮扩增，扩增条件为：变性 94°C 、 1 分钟；退火 60°C 、 45 秒钟；链延伸 72°C 、 2 分钟．第一轮 PCR 的反应混合物含有 2 ul 的 5'-RACE-ready 脾 cDNA 、 1 ul 的锚引

物、和 1 ul 的 88c-r4 引物(100 ng/ul)，反应总体积为 50 ul． 88C 的特异引物 88c-r4（ 5'-GATAAGCCTCACAGCCCTGTG-3'）见 SEQ ID NO:7，其序列与 SEQ ID NO:1 中 745-765 核苷酸的反义链顺序一致。第二轮 PCR 的反应混合物包含 1 ul 的首轮 PCR 产物、 1 ul 的锚引物、和 1 ul 的引物 88C-r1b(100 ng/ul)． 88C-r1b 的序列为 5'-GCTAAGCTTGATGACTATCTTTAATGTC-3'并见 SEQ ID NO:8．引物 88C-r1b 的序列含有一个 HindIII 酶切位点（划线核苷酸）． HindIII 酶切位点的 3'序列与 SEQ ID NO:1 中 636-654 核苷酸的反义链一致。得到的 PCR 产物用 EcoRI 和 HindIII 消化并用 1%的琼脂糖凝胶电泳分离，回收大小约 700bp 的 DNA 片断，并将其克隆到 pBluescript 上。对插入片断最大的克隆进行测序分析。另外，还可以用一种商业化的 TA 克隆试剂盒将完整的 PCR 产物连接到 pCR 载体上（ Invitrogen Corp., San Diego, CA)进行测序分析。

88-2B 和 88C 的序列测定使用 PRISM^{TM}Ready Reaction DyeDeoxy^{TM} Terminator Cycle 测序试剂盒(Perkin Elmer Corp., Foster City, CA)和 Applied Biosystems 373A DNA 测序仪。使用克隆 777 的插入片断作为 88-2BcDNA 的双链测序模板。所测得克隆 777 完整插入片断的序列作为 88-2B 的 cDNA 序列与由其推导出的氨基酸顺序在 SEQ ID NO:3 列出。这段插入序列长 1915 bp，包括 361 bp 的 5'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:3 的 1-361 核苷酸）、 1065 bp 的编码区（对应于 SEQ ID NO:3 的 362-1426 核苷酸）、 489bp 的 3'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:3 的 1427-1915 核苷酸）． 88-2B 的基因组 DNA（见上文实施例 1）对应于 SEQ ID NO:3 的 746-1128 核苷酸。 88C 的 cDNA 序列及由其推导出的氨基酸顺序见 SEQ ID NO:1． 88C 的 cDNA 是由 RACE-PCR cDNA、克隆 134 和克隆 101 的测序结果拼组而来。以 RACE-PCR cDNA 为模板测定了 SEQ ID NO:1 的 1-654 核苷酸，其中包括独特的对应于 SEQ ID NO:1 的 1-9 核苷酸的 9 bp 5'非翻译区。由 RACE-PCR cDNA 的测序结果证实 88C 的第一个甲硫氨酸密码子位于 SEQ ID NO:1 的 55-57 核苷酸，并支持克隆 134 和 101 含有 88C 的全部编码区这一观点。克隆 134 含有 45 bp 的 5'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:1 的 10-54 核苷酸）、1056bp 的 88C 编码区（对应于 SEQ ID NO:1 的 55-1110 核苷酸）及 492bp 的 3'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:1 的 1111-1602 核苷酸）．克隆 101

含有 25 bp 的 5'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:1 的 30-54 核苷酸）、1056bp 的 88C 编码区（对应于 SEQ ID NO:1 的 55-1110 核苷酸）及 2273bp 的 3'非翻译区（对应于 SEQ ID NO:1 的 1111-3383 核苷酸）。前面实施例 1 中介绍的 88C 基因组 DNA 对应于 SEQ ID NO:1 的 424-809 核苷酸。

推导而来的 88-2B 和 88C 氨基酸顺序表现出 GPCR 的疏水特征，它们有七个与 GPCR 跨膜结构域一致的疏水结构域。将它们的序列与其它 GPCR 相比也可看出一定程度的同源性。特别有意义的是，推导而来的 88-2B 和 88C 氨基酸顺序与趋化因子受体的氨基酸顺序有最高的同源性。表 1 列出了这些氨基酸顺序进行比较的结果。

趋化因子受体	88-2B	88C
IL-8RA	30%	30%
IL-8RB	31%	30%
CCCKR1	62%	54%
CCCKR2A	46%	66%
CCCKR2B	50%	72%
88-2B	100%	50%
88-C	50%	100%

表 1 显示： 88-2B 与 CCCKR1 最相似（ 62%的氨基酸同源性）；88C 与 CCCKR2 最相似（ 72%的氨基酸同源性）。

推导而来的 882B 和 88C 氨基酸顺序也表现出 GPCR 的胞内和胞外结构域特征。 88-2B 的胞外结构域对应于 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 所示氨基酸顺序的 1-36 、 93-107 、 171-196 和 263-284 氨基酸残基。 88-2B 的胞外结构域由对应于 SEQ ID NO:3 中的 362-469 、 638-682 、 872-949 和 1148-1213 核苷酸的多核苷酸序列编码。 88C 的胞外结构域包括 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中的 1-32 、 89-112 、 166-191 和 259-280 氨基酸残基。 88C 的胞外结构域由对应于 SEQ ID NO:1 中的 55-150 、 319-390 、 550-627 和 829-894 核苷酸的多核苷酸序列编码。 88-2B 的胞内结构域包括 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 中的 60-71 、 131-151 、 219-240 和 306-355 氨基酸残基。这些结构域分别由对

应于 SEQ ID NO:3 中的 539-574、752-814、1016-1081 和 1277-1426 核苷酸的多核苷酸序列编码. 88C 的胞内结构域包括 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 中的 55-67、125-145、213-235 和 301-352 氨基酸残基. 这些结构域分别由对应于 SEQ ID NO:1 中的 220-255、427-489、691-759 和 955-1110 核苷酸的多核苷酸序列编码.

另外，使用对应于人 88C cDNA5'和 3'两翼区域的引物，用 PCR 的方法扩增了一个恒河猴的 88CDNA，所用的 5'端引物对应于紧接甲硫氨酸起始密码子并包括甲硫氨酸起始密码子的上游区域，而 3'端引物则与紧接终止密码子的下游区域互补. 两个引物中含有酶切位点，可将扩增产物克隆到表达载体上。5'端引物的序列为 GACAAGCTTCACAGGGTGGAACAAGATG（划线部分为 HindIII 酶切位点）（SEQ ID NO:17），3'端引物的序列为 GTCTCTAGACCACTTGAGTCCGTGTCA（划线部分为 XbaI 酶切位点）（SEQ ID NO:18）. 扩增的起始条件为 94°C、8 分钟，然后进行 40 个循环的扩增。每轮扩增的条件为：变性 94°C、1 分钟、退火 55°C、45 秒钟、链延伸 72°C、1 分钟。扩增产物克隆到 pcDNA3 的 HindIII 和 XbaII 酶切位点上. 最后得到了一个克隆并进行了序列测定。全长的恒河猴 cDNA 序列及由之推导的氨基酸顺序分别见 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20. 恒河猴 88C 的核苷酸序列与人 88C 的核苷酸序列有 98%的同源性，由两者推导而来的氨基酸顺序有 97%的同源性。

实施例 3

88-2B 和 88CmRNA 的表达图谱用 Northern 印迹法进行了测定。

所用的 Northern 印迹购自 Colntech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA.，含有固定化的人多种组织的 poly A^+ RNA。特别对下列组织进行了检测：心脏、脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、肾脏、胰腺、脾、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠以及外周血中的白细胞。

用 cDNA 克隆 478 制备了一个 88-2B 核苷酸序列的特异性探针。克隆 478 的 cDNA 插入片断含有与 SEQ ID NO:3 中 641-1915 核苷酸一致的序列。制备这一探针的过程为：先将克隆 478 消化并用凝胶电泳分离 DNA 插入片断，然后用本领域通用的方法用 ^{32}P 标记核苷酸对插入片断进行放射性标记。

通过分离和标记克隆493中发现的DNA插入片断，制备了一个88C核苷酸序列的特异性探针．克隆493的DNA插入片断含有与SEQ ID NO:1中421-1359核苷酸一致的序列．同样，这一探针的制备也运用了包含^{32}P标记核苷酸等传统技术．

以88-2B为探针的Northern印迹在外周血白细胞中发现了一种长度约1.8 kb的mRNA．88C Northern试验表明在多种人组织中存在一种长度约4kb的mRNA，包括在脾或胸腺组织中用探针检测到的强阳性信号和在外周血白细胞及小肠中略弱的阳性信号．用88C探针在肺组织和卵巢组织中也得到了相对弱的阳性信号．

88C在人T细胞和造血细胞系中的表达也用Northern印迹法进行了检测．88C在$CD4^+$和$CD8^+$T细胞中的水平非常高．转录水平在髓样细胞系THP1和HL-60中也相对较高，在B细胞系Jijoye中也发现了同样的现象．另外，在用PCR方法扩增而来的人巨噬细胞cDNA文库中，88C的转录水平相对较高．

实施例4

用重组方法在哺乳动物细胞中表达88-2B和88C的cDNA．

为进行瞬时转染实验，先将88C亚克隆到哺乳动物细胞表达载体pBJ1[Ishi,K等，《生物与化学杂志》(J. Biol. Chem) 270:16435-16440(1995)]上．这一载体含有一段编码催乳素信号肽的序列，可以让重组产物在细胞表面有效表达．88C的氨基端有一个FLAG表位，可用于表达产物的检测．这个FLAG表位含有“DYKDDDD”氨基酸顺序．按产品说明，使用脂质转染胺(Life Technology, Inc., Grand Island, NY)将88C表达载体瞬时转染至COS-7细胞中．简单地说，先将细胞按4×10^4每孔接种到24孔板上培养过夜，然后用PBS洗涤细胞，将0.3 mgDNA和1.5 ul脂质转染胺在0.25 ml Opti-MEM中混匀并加入到每个孔中．37°C、5小时后，用含10%FCS的培养基取代原来的培养基．使用FLAG表位的特异性抗体M1(Eastman Co., New Haven, CT)进行定量ELISA证实88C在瞬时转染的COS-7细胞的细胞表面上有表达．

按厂家推荐的方法使用转染试剂DOTAP（N-[1-[（2,3-二油酰基氧）丙基]-N,N,N-三甲基铵]甲基硫酸盐，Boehringer-Mannheim, Inc., Indianapolis, IN)，FLAG标记的88C受体也可稳定转染到HEK-293细

胞中，HEK-293是一种人胚肾细胞系。在有药物G418存在的条件下选择稳定的细胞系。使用针对FLAG表位的抗体M1，用ELISA方法评价88C在转染后HEK-293细胞表面的表达。ELISA的结果表明，FLAG表位标记的88C在稳定转化的HEK-293细胞表面获得了表达。

使用88-2B和88C的cDNA来获得稳定的HEK-293转染子。先用PCR方法将88-2B受体的cDNA克隆到pRc/CMV(Invitrogen Corp., San Diego, CA)上巨细胞病毒启动子的后面。PCR反应所用的模板为克隆777中的cDNA插入片断。两条引物为88-2B-3（内含XbaII酶切位点）和88-2B-5（内含HindIII酶切位点）。88-2B-3的核苷酸序列见SEQ ID NO:9，88-2B-5的核苷酸序列见SEQ ID NO:10。cDNA上一个1104 bp的区域得到了扩增。扩增完成后，用XbaII和HindIII酶切得到的DNA，并将其克隆到用相同酶切处理的pRc/CMV上。所获得的重组质粒命名为777XP2。777XP2含有18bp的5'端非翻译区、88-2B的完整编码区和3bp的3'非编码区。对于88C来说，克隆134的全长cDNA插入片断在转染HEK-293前不需进一步加工。

为获得稳定的转化细胞系，按厂家推荐的方法使用转染试剂DOTAP(N-[1-[(2,3-二油酰基氧）丙基]-N,N,N-三甲基铵]甲基硫酸盐，Boehringer-Mannheim, Inc., Indianapolis, IN)将pRc/CMV重组子转染到人胚肾细胞系HEK-293中。用标准筛选方法（即Northern印迹法）鉴定能高水平产生88-2B和88C mRNA的稳定细胞系。

实施例5

A. Ca^{++}流动试验

为了分析多肽的表达，我们采用了一个检测趋化因子受体活性的功能试验。已知的趋化因子受体在传导信号时有一个共同的特征，那就是在信号传导过程中伴随着细胞内Ca^{++}的释放。因此可以通过分析转染后HEK-293细胞内Ca^{++}的浓度来判断88-2B或88C受体是否对任何一种已知趋化因子产生应答。

将用上文所述的方法稳定转染了88-2B、88C（不含编码FLAG表位的序列）或一种对照序列（编码IL-8R或CCCKR2，见下文）的HEK-293细胞在T75培养瓶中培养至约90%汇合，所用的培养基为MEM+10%血清。用Versene（0.6mM EDTA, 10mM Na_2HPO_4, 0.14M

NaCl, 3mM KCl, 1mM 葡萄糖)洗涤并收集细胞，在 MEM+10%血清+1uM Fura-2 AM(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)中室温温育 30 分钟，其中 Fura-2 AM 是一种 Ca^{++}敏感的染料．用含有 0.9 mM $CaCl_2$ 和 0.5 mM $MgCl_2$ 的 Dulbecco's 磷酸缓冲盐（ D-PBS ）重新悬浮细胞并将其浓度调整至约 10^7 细胞/毫升，用一台荧光分光光度计(Hitachi Model F-4010)监测荧光的变化．将 1.8ml 悬浮有约 10^6 细胞的 D-PBS 加入维持在 37°C 的测量杯中，激发波长在 340nm 和 380 nm 之间以 4 秒钟为间隔进行改变．发射波长为 510nm ，待测化合物由注射接口加入．最大 Ca^{++}流动通过加入离子霉素进行测量．

在表达 IL-8RA 的细胞中用 IL-8 刺激可以观测到阳性应答，用 MCP-1 或 MCP-3 刺激表达 CCCKR2 的细胞也可以观测到阳性应答。但表达 88-2B 或 88C 的 HEK-293 细胞在与下列趋化因子作用时，却观测不到细胞内 Ca^{++}的浓度变化，这些趋化因子包括： MCP-1 、 MCP-2 、 MCP-3 、 MIP-1α 、 MIP-1β 、 IL8 、 NAP-2 、 gro/MGSA 、 IP-10 、 ENA-78 、 PF-4 (Peprotech, Inc., Rocky Hill, NJ).

用一种更敏感的试验，将表达 88-2B 的细胞在有 Fura－2AM 的情况下与 RANTES 作用，可以观测到应答于 RANTES 的 Ca^{++}流动，这一试验所用的细胞和试剂均按前述方法制备． RANTES(Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted)是一种 CC 族趋化因子，已经证明这种趋化因子是嗜酸性粒细胞的化学吸引剂和激活剂（见上文 Neote 等）。这种细胞因子还可介导嗜碱性粒细胞释放组胺，并在体外具有记忆 T 细胞化学吸引剂的功能。因此， 88C 受体活性的调节对于调节白细胞活性是有用的．

FLAG 标记的 88C 受体在 HEK-293 细胞中进行表达，其与趋化因子的相互作用用 Ca^{++}流动试验进行检测． 88C 在细胞表面的表达用 M1 抗体通过 ELISA 和 FACScan 进行证实．在浓度为 100nM 时，趋化因子 RANTES 、 MIP-1α 、和 MIP-1β 都能在 88C-转染细胞中诱导 Ca^{++}流动．

Ca^{++}流动试验还可设计用于鉴定趋化因子受体结合活性的调节剂．在有待测化合物存在的条件下进行前述的荧光检测试验或显微镜检测试验，如果在存在待测化合物时 Ca^{++}流动增加，说明这种化合物为趋化因子受体结合活性的激活剂；如果 Ca^{++}流动减少，则表明待测化合物

是趋化因子受体结合活性的抑制剂.

B 磷酸肌醇水解

另一个检测配体或调节剂的试验包括磷脂酶C活性的监测[见Hung等,《生物与化学杂志》(J. Biol. Chem.) 116:827-832(1992)]. 首先,将表达一种趋化因子受体的细胞用^{3}H-肌醇标记24小时.在细胞中加入待测化合物(即可能的配体), 37°C温育15分钟. 然后用20 mM的甲酸溶解细胞并抽提磷酸肌醇代谢的水解产物(即磷脂酶C介导的水解反应产物). 抽提物用一个AG1X8阴离子交换柱(甲酸型)进行阴离子交换层析.磷酸肌醇用2M甲酸铵/0.1M甲酸洗脱,带有^{3}H标记的化合物用液闪分光光度计测定.磷脂酶C试验也可用于鉴定趋化因子受体活性的调节剂. 试验方法与前面介绍的方法相同,只是多加入一种可能的调节剂. 如果标记物的水平升高,就表明这种调节剂是一种激活剂;而标记物的水平降低则说明调节剂是一种趋化因子受体活性的抑制剂.

磷脂酶C试验也可用于鉴定FLAG-标记的88C受体的趋化因子配体. 在转染后约24小时,表达88C的COS-7细胞用肌-[2-^{3}H]肌醇(1 uCi/ml)标记20-24小时. 标记时所用的培养基含10%透析过的FCS且不含肌醇. 标记后的细胞用含有10 mM LiCl且不含肌醇的DMEM洗涤,然后在含有10 mM LiCl和下列一种趋化因子且不含肌醇的DMEM中37°温育1小时,所用的趋化因子包括: RANTES、MIP-1β、MIP-1α、MCP-1、IL-8或鼠的MCP-1同系物JE. 磷酸肌醇(IP)的生成用上段所述的方法进行分析. 在与趋化因子一起温育后,将培养基吸出并加入0.75 ml冰冷的20 mM甲酸(30分钟). 将上清装入AG1-X8 Dowex柱 (Biorad. Hercules, CA)并迅速加入时3 ml 50 mM的NH_4OH. 然后用4 ml 40 mM的甲酸铵洗柱,接着用2 M的甲酸铵洗脱. 通过测量beta射线计算磷酸肌醇的总量.

由于发现某些趋化因子受体如IL-8RA和IL-8RB只有在与一种外源G蛋白共转染时,才能在COS-7细胞中产生可检测到的信号传导,因此88C受体与嵌合G蛋白Gqi5进行了共表达[Conklin等,《自然》(Nature) 363:274-276,(1993)]. Gqi5是一种Gi(受体结合部位)羧基端的五个氨基酸被剪接到Gαq的G蛋白. 与Gqi5一起共转染明显增强了由CCCKR1和CCCKR2传导的信号. Gqi5共转染显示88C在应

答 RANTES 、 MIP-1β 和 MIP-1α 时能很好地传导信号，但不能对 MCP-1 、 IL-8 或鼠 MCP-1 同系物 JE 产生应答. 剂量应答曲线显示 RANTES 、 MIP-1β 和 MIP-1α 的 EC_{50} 值分别为 1 nM 、 6 nM 和 22 nM .

88C 是第一个克隆到的与 MIP-1β 应答传导信号的人受体. 与其它 CC 族趋化因子相比， MIP-1β 明显有一个独特的细胞激活谱. 它似乎能激活 T 细胞而不能激活单核细胞(见上文 Baggiolini 等)，这与受体刺激研究所获得的结果一致. 例如， MIP-1β 与 CCCKR1 结合时不能诱导 Ca^{++}流动(见上文 Neote 等). 相反， MIP-1α 和 RANTES 能够与 CCCKR1 和 CCCKR5 结合并传导信号（ RANTES 还能激活 CCCKR3 ）. 这样看来 MIP-1β 与其它 CC 族趋化因子相比更具有选择性. 这种选择性具有治疗意义，因为这样可以刺激一个特定有益的活性（如抑制 HIV 感染）而不会刺激多种白细胞群体从而导致广泛的炎症活性.

C 结合试验

另一个用于分析受体与趋化因子相互作用的试验为修改的 Ernst 结合试验[Ernst 等，《免疫学杂志》(J. Immunol.) 152:3541-3549(1994)]. MIP-1β 用 Bolton 和 Hunter 试剂(二碘化物, NEN, Wilmington, DE)按产品说明进行标记. 通过 PD-10 柱(Pharmacia)洗脱使未连接的二碘化物与标记好的蛋白分离， PD-10 在使用前用 PBS 和 BSA(1% w/v)平衡. 特异活性一般为 2200 Ci/mmole . 平衡结合按如下步骤进行: 在聚丙烯管内加入 5×10^5 HEK-293 细胞，该细胞已转染了 FLAG 标记的 88C . 将 ^{125}I 标记的配体与或不与 100 倍过量的非标记配体一起加入到细胞中，反应总体积为 300 ul(50 mM 的 HEPES pH7.4, 1 mM 的 $CaCl_2$, $MgCl_2$, 0.5%的 BSA). 27°C 、 150rpm 振荡温育 90 分钟. 用 Skatron 细胞收集仪(Skatron Instruments Inc., Sterling, VA) 将细胞收集到预先用 0.3%的聚乙烯亚胺和 0.2%BSA 浸泡过的玻璃纤维滤膜上，漂洗并取出滤膜，通过计量 gamma 射线计算结合的配体. 非标记配体竞争条件下的配体结合用 5×10^5 的转染细胞〔同上〕与 1.5 nM 的放射性标记配体和指定浓度的非标记配体一起温育，按前述方法对样品进行收集、洗涤和计量. 用曲线拟合程序 Prism(GraphPad Inc., San

Diego, CA)和迭代非线性回归程序 LIGAND(PM220)对获得的数据进行分析.

在平衡结合试验中, 88C 受体与放射性标记 MIP-1β 的结合具有专一性和饱和性, 用 Scatchard 的方法对这一结合的数据进行分析发现其解离常数(Kd)为 1.6 nM . 用标记的 MIP-1 α 所做的竞争结合试验表明 88C 与 MIP-1β(IC_{50} =7.4nM)、 RANTES(IC_{50} =6.9 nM)和 MIP-1α(IC_{50} =7.4 nM)都能高亲和地结合, 这一结果与上文 B 节中由瞬时转染的 COS-7 细胞获得的信号传导数据一致.

实施例 6

已经发现 MIP-1α 、 MIP-1β 及 RANTES 能抑制 HIV-1 和 HIV-2 在人外周血单核细胞和 PM1 细胞中的复制(见上文, Cocchi 等)。鉴于这一发现以及例 5 中所述的结果, 本发明认为激活 88C 受体或用配体与 88C 受体结合可在 HIV 感染中提供保护作用。

最近, 有报导说孤儿 G 蛋白偶联受体融合素(fusin)可作为 HIV 侵入的辅助受体. 融合素/CXCR4 与 HIV 的主要受体 CD4 组合, 能明显促进 HIV 对 T 细胞培养物的感染[Feng 等,《科学》 (science) 272:872-877(1996)]。基于融合素与趋化因子受体的同源性及 88C 的趋化因子结合能力, 并且由于 88C 在 T 细胞中为组成型表达且在巨噬细胞中表达量丰富, 88C 很可能参予了病毒和 HIV 的感染。

用 88C 或 88-2B 转染表达 CD4 的细胞, 并用 HIV 进行攻击, 证明 88C 和 88-2B 具有 HIV 辅助受体功能。只有当细胞同时表达 CD4 和一种有功能的辅助受体时, HIV 才能感染细胞。 HIV 感染可用多种方法测定。用来检测 HIV 抗原表达的 ELISA 试剂盒可由商业途径购得, 如 Coulter HIV-1 $_{p}$24 antigen assay (US Patent Nos.4,886,742), Coulter Corp., 11800 SW 147th Ave., Miami, FL 33196 。另外, 还用基因工程的方法使待测细胞表达一个报告基因如 LACZ , 并将这一基因连接在 HIV LTR 启动子的后面[Kimpton 等, 《病毒学杂志》 (J. Virol.),66:2232-2239(1992)]. 在这个方法中, 感染 HIV 的细胞可用比色试验进行检测。

88C 瞬时转染至一个猫细胞系 CCC[Clapham 等, 181:703-715(1991)] 中, 这一细胞已稳定转染了人 CD4 并能表达人 CD4

（ CCC-CD4 ）。通常情况下，这种细胞能够抵抗任何 HIV-1 株的感染，因为这种细胞本身不表达 88C 。在实验中，将 88C 克隆到表达载体 pcDNA3.1(Invitrogen Corp., San Diego, CA)上，并用脂质转染胺(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)瞬时转染到 CCC/CD4 细胞中。转染两天后用 HIV 攻击转染细胞。温育 4 天，将细胞固定染色，观测 p24 抗原作为 HIV 感染的指标。88C 的表达使转染细胞对多株 HIV-1 的感染敏感。这些 HIV 株包括四种原代非合胞体诱导型 HIV-1 分离株（ M23 、 E80 、 SL-2 和 SF-162 ），它们都只能以 88C 作辅助受体而不能用融合素作辅助受体。几种原代合胞体诱导型 HIV-1 株（ 2006 、 M13 、 2028 和 2076 ）则可用 88C 或融合素作辅助受体。而且，两种克隆化的 HIV-1 病毒（ GUN-1 和 89.6 ）也可使用 88C 或融合素作辅助受体。

有报导说某些 HIV-2 株可感染特定的 CD4 阴性细胞系，这暗示 HIV-2 可以不需 CD4 而直接与一种受体作用[Clapham 等，《病毒学杂志》(J. Virol.) 66:3531-3537(1992)]。对某些 HIV-2 株来说，可溶性的 CD4 （ sCD4 ）可促这种感染。因为 88-2B 与其它可作为 HIV 辅助受体的趋化因子受体（即 88C 和融合素）有很高的同源性， 88-2B 很可能是 HIV-2 的辅助受体。 88-2B 作为一种 HIV-2 辅助受体的作用可用 HIV-2 的 ROD/B 株进行证明。内源不表达 CD4 的猫 CCC 细胞用 88-2B 进行转染。在实验中，先用脂质转染胺将带有 88-2B 的 pcDNA3.1 转染到细胞中， 48 小时后用 HIV-2 进行感染，在感染三天后，用免疫染色的方法检测 HIV-2 包膜糖蛋白的存在。在 $HIV\text{-}2_{ROD/B}$ 攻击时存在 sCD4 可使感染的细胞增加 10 倍。 HIV-2 侵入 88-2B 转染细胞可为 400-800 ng/ml 的 eotaxin 所阻断， eotaxin 是 88-2B 的一种配体。 CCC/88-2B 细胞的基础感染水平（没有可溶性的 CD4 ）与没有用 88-2B 转染的 CCC 细胞相同。

通过制备稳定转化并表达 88C 或 88-2B 的细胞系并用 HIV 和 SIV 的多种分离株进行攻击，已经证实了 88-2B 和 88C 作为 HIV 辅助受体的作用。这些结果在例 7 中介绍。

另外， 88C 和 88-2B 的辅助受体功能也可用不需使用活病毒的实验方法进行证明。在这种方法中，共表达 88C 或 88-2B 、 CD4 和一个 LACZ 报告基因的细胞系与共表达 HIV 包膜糖蛋白（ ENV ）和一个报

告基因转录因子的细胞系进行混合[Nussbaum 等,1994，《病毒学杂志》(J. Virol.) 68:5411]，表达有功能的 HIV 辅助受体的细胞将会与表达 ENV 的细胞融合从而使报告基因表达．在这一方法中，用比色试验检测到报告基因就说明 88C 或 88-2B 具有 HIV 辅助受体功能．

趋化因子抑制病毒感染的机制还不清楚．一种可能的机制是趋化因子结合引起受体活化．趋化因子结合导致细胞内信号传导，使细胞能抵抗病毒的感染和/或阻止病毒在细胞内复制．与干扰素诱导类似，细胞将分化以抵抗病毒的感染或建立一种抗病毒状态．另一种可能的机制是，趋化因子的结合通过阻断病毒包膜糖蛋白与辅助受体靠近，直接干扰了病毒进入细胞．在这一机制中，趋化因子抑制病毒感染不需要 G 蛋白信号传导。

为弄清 88C 和 88-2B 究竟以这两种机制中哪一种来行使其病毒或 HIV 感染的辅助受体功能。我们将趋化因子与受体的结合同信号传导解偶联，并测定趋化因子对病毒感染的抑制效果。

配体结合与信号传导解偶联可通过加入能抑制 G 蛋白介导信号传导的化合物如百日咳毒素和霍乱毒素来实现。另外，下游的效应多肽可用其它化合物如渥曼青霉素来抑制。如果 G 蛋白信号传导参予病毒感染的抑制，加入这些化合物将会阻止趋化因子对病毒感染的抑制。此外还可将 88C 和 88-2B 受体与 G 蛋白偶联所需的结构域或关键氨基酸残基改变或删除。这样就可改变或破坏其与 G 蛋白的偶联而不影响趋化因子的结合。

在这种情况下，如果趋化因子不能抑制病毒或 HIV 的感染，就说明 G 蛋白信号传导对于抑制病毒和 HIV 感染是必需的；反之，如果趋化因子能够抑制病毒的感染，说明 G 蛋白信号传导不是趋化因子抑制病毒感染所必需的，趋化因子的保护作用可能是通过阻断病毒利用受体来实现的。

另一条证明途径包含 88C 或 88-2B 特异性抗体的使用。某些抗体能与 88C 或 88-2B 结合但不引起 G 蛋白信号传导，这种抗体能阻断受体上趋化因子或病毒的结合位点。如果在有 88C 或 88-2B 抗体的情况下，病毒的感染受到抑制，就说明趋化因子的保护机制是阻断病毒与受体的结合。 Feng 等人报导，针对融合素受体氨基端的抗体能抑制 HIV 感染(Feng 等,1996).

实施例 7

用稳定转化了 88C 或 88-2B 的细胞系来进一步说明 88C 和 88-2B 在 HIV 感染中所起的作用. Kimpton 和 Emerman 在《通过激活整合β-半乳糖苷酶基因检测敏感细胞系中有复制能力的假型人免疫缺陷病毒》(Detection of Replication-Competent and Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus with a Sensitive Cell Line on the Basis of Activation of an Integrated Beta-Galactosidase Gene), 《病毒学杂志》(J.Virol) 66(5):3026-3031(1992)中介绍了一个指示细胞系, 在这里我们称之为 HeLa-MAGI 细胞. HeLa-MAGI 细胞是稳定转化了 CD4 并能表达 CD4 的 HeLa 细胞, 这种细胞还整合有能启动染色体中β-半乳糖苷酶基因表达的 HIV-1 LTR . 在细胞中整合一个 HIV 原病毒将会导致细胞合成病毒的反式激活因子 Tat , 后者又会启动β-半乳糖苷酶基因的表达。用 X-gal 原位检查细胞的β-半乳糖苷酶活性, 阳性细胞的数量直接与受感染细胞的数量呈正比。

这种 HeLa -MAGI 细胞可以检测出实验室获得的 HIV - 1 分离株, 但却只能检出少数原代分离株[见上文, Kimpton 和 Emerman], 而且这种细胞不能检出多数 SIV 分离株[Chackerian 等,《能被多种猴免疫缺陷病毒分离株感染并且经一个复制循环即可检测出病毒的 CD4 表达恒河猴细胞系的鉴定》(Characterization of a CD4-Expressing Macaque Cell Line that can Detect Virus After A Single Replication Cycle and can be infected by Diverse Simian Immunodeficiency Virus Isolates) 《病毒学》(Virology),213(2):6499-6505(1995)].

另外, Harrington 和 Geballe 在《 I 型人免疫缺陷病毒进入表达 CD4 的人细胞系必需的辅助因子》(Co-Factor Requirement for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into a CD4-expressing Human Cell Line), 《病毒学杂志》(J. Virol.), 67:5939-5947(1993)一文中介绍了一个 U373 细胞衍生的细胞系. U373 细胞已通过基因工程技术改造, 能表达 CD4 和与上文相同的 LTR-β-半乳糖苷酶. 这个细胞系在这里我们称之为 U373-MAGI . 已经发现 U373-MAGI 细胞系不能被任何 HIV 株(M 向性或 T 向性)感染, 但在与 HeLa 细胞融合后却对感染敏感[见上文,Harrington 和 Geballe].

为构建既能用来检测巨噬细胞向性病毒又能检测 T 细胞向性病毒的指示细胞系，我们用一个逆转录病毒载体将编码表位标记的 88C 或 88-2B 的 DNA 转染到 HeLa-MAGI 或 U373-MAGI 细胞中，分别得到 HeLa-MAGI-88C 或 U373-MAGI-88C 细胞系。用抗 FLAG 的 M1 抗体对活细胞进行免疫染色或用 RT-PCR 来证明辅助受体在细胞表面的表达。

用于构建 HeLa-MAGI-88C 和 U373-MAGI-88C 的 88C 和 88-2B 基因与实施例 4 中介绍的一样，含有编码催乳素信号肽的基因序列，在编码催乳素信号肽的基因后面为编码一个 FLAG 表位的序列。这段基因插入在逆转录病毒载体 pBabe-Puro[Morgenstern 和 Land，《核酸研究》(Nucelic Acids Research), 18(12):3587-3596 (1990)]上。高滴度的逆转录载体与 VSV-G 蛋白组成假型病毒，这种假型病毒是按 Bartx[Bartx 等，《病毒学杂志》(J. Virol.) 70:2324-2331(1996)]所述用瞬时转染的方法制备的。用这种假型病毒感染 HeLa-MAGI 细胞和 U373-MAGI 细胞。将能抵抗 0.6 ug/ml 嘌呤霉素（ HeLa ）或 1 ug/ml 嘌呤霉素（ U373 ）的细胞合并收集，每个合并物中至少含 1000 个独立的转导子。用原代 HeLa-MAGI [见上文, Kimpton 和 Emerman]细胞的早期传代物（第二代）来制备 HeLa-MAGI-88C 细胞。

按 Kimpton 和 Emerman（见上文）介绍的方法， HIV 感染指示细胞系在 12 孔板中用 300ul 病毒的 10 倍梯度血清稀释物在存在 30 ug/ml DEAE-Dextran 的情况下进行。

所有 HIV 株和 $SIV_{mac239go}$ 来自 NIH AIDS Reference and Reagent Program . 原代 $HIV\text{-}2_{7312A}$[Gao 等，《 2 型人类免疫缺陷病毒的遗传多样性: 独特序列亚型在病毒生物学上的差异的证据》(Genetic Diversity of Human Immunodeficiency virus Type 2: Evidence for Distinct Sequence Subtypes with Differences in Virus Biology,)《 病毒学杂志》(J. Virol.),68(11):7433-7447(1992)]和 SIVsmPbj1.9[Dewhurst 等，《分子克隆的 SIV_{smm}-PBj14 的序列分析和急性病理学》（ Sequence Analysis and Acute Pathogenicity of Moleularly Cloned SIV_{smm}-PBj14 ），《自然》(Nature),345:636-640 (1990)]的分子克隆来自 B.Hahn （ UAB ）处. 其它所有 SIV_{mne} 分离株都从 Julie Overbaugh(U. Washington. Seattle) 处获得. 克隆原病毒产生的原种用瞬时转染 293 细胞来制备. 其它病毒

原种用病毒在人外周血单核细胞或 CEMx174 细胞（用于 SIV 原种）中包装来制备。病毒原种用 ELISA 、 $p24^{gag}$(Coulter Immunology)或 $p27^{gag}$(Coulter Immunology)按厂商提供的标准方法分别归类于 HIV-1 和 HIV-2/SIV 。

U373-MAGI-88C 细胞和 U373-MAGI 细胞（对照）用一株 T-向性的 HIV-1(HIV_{LAI})、一株 M-向性的 HIV-1(HIV_{YU-2})、一株 SIV 分离株($SIV_{MAC}239$)的有限稀释物进行感染。通过计算每孔中单位体积的病毒产生蓝色细胞的数目来测量感染能力（表 2 ）。

表 2

病毒株 [a]	细胞系中的滴度(IU/ml)[b]	
	U373-MAGI	U373-MAGI-88C
$HIV\text{-}1_{LAI}$	< 100	< 100
$HIV\text{-}1_{YU-2}$	< 100	2.2×10^6
$SIV_{MAC}239$	1.2×10^3	4×10^5

[a] 由分子克隆转染 293 细胞得到的病毒

[b] 每毫升的感染单位（ IU ）是将病毒的稀释物换算成 1 毫升终体积后，在每孔中产生的蓝色细胞数乘以稀释倍数。

感染两天后，将细胞固定，用 X-gal 染色检测其β-半乳糖苷酶活性。U373 衍生的 MAGI 细胞在 37°C 染色 120 分钟， HeLa 衍生的 MAGI 细胞在 37°C 染色 50 分钟，非感染细胞的背景染色不会超过每孔大约 3 个蓝色细胞。只计算深蓝色的细胞，有多个核的合胞体只计算成一个感染细胞。感染滴度为病毒上清稀释物换算成 1ml 在每孔中产生的蓝色细胞数乘以稀释倍数。 HIV_{YU-2} 感染 U373-MAGI-88C 的滴度为 2×10^6，而 $HIV\text{-}1_{LAI}$ 感染 U373-MAGI-88C 的滴度少于 100 。特定 HIV 株对 88C 的特异性可相差 4 个数量级。

虽然 $SIV_{MAC}239$ 在 U373-MAGI-88C 中的感染滴度高达 4×10^5，它仍明显能感染 U373-MAGI 细胞（表 2 ）。

下一步，分析一系列原代非克隆的 HIV 株和克隆的 M 向性 HIV-1 株感染表达 88C 的指示细胞系的能力。

按上文介绍的方法，用各种 HIV 株的有限稀释物感染 HeLa-MAGI

细胞和 HeLa-MAGI-88C 细胞．两种克隆的 M 向性病毒 HIV_{JR-CSF} 和 HIV_{YU-2} 都能感染 HeLa-MAGI-88C 细胞而不能感染 HeLa-MAGI 细胞，这表明两种病毒都需要 88C 作为辅助受体（见表 3，说明 c）。但是这两种病毒感染 HeLa-MAGI-88C 细胞的能力相差很大，HIV_{YU-2} 和 HIV_{JR-CSF} 的滴度分别为 6.2×10^5 和 1.2×10^4IU/ml．病毒原种的感染力（表 3）是每个物理颗粒的感染单位数量（这里用病毒核心蛋白的数量表示）。另外，在分别制备这两种病毒的原种时还发现，它们的克隆株在感染力方面也相差超过 50 倍。

原代病毒分离株之间感染能力的差别进一步通过分析来自三个分化单位的 12 株未克隆病毒原种来进行检查（表 3）。所用的分化单位 A 的三个原代分离株、分化单位 E 的三个原代分离株和三个额外的分化单位 B 分离株分别来自不同的地理来源．所有九株原代 HIV 株只能用 HeLa-MAGI -88C 细胞进行检测而不能使用 HeLa-MAGI 细胞（表 3）。检测到的感染效率从每 ng $p24^{gag}$ 5 个感染单位到超过 100 个感染单位（表 3）。这一结果表明：M-向性株的绝对感染能力相差非常大且与所属的分化单位无关。可用来解释这种差异的假说涉及每个病毒株的 V3 环在同 CD4 结合后与 88C 的亲和力．[Trkola 等，《自然》(Nature),384(6605):184-187 (1996); Wu 等，《自然》(Nature), 384(6605): 179-183 (1996)]。

表 3

病毒株 [a]	病毒亚型(来源国家)[b]	HeLa-MAGI-88C 上的滴度(IU/mg)[c]	$p24^{gag}$ ng/ml	感染力 [d]
$HIV\text{-}1_{YU-2}$	B(美国)	6.2×10^5	2200	281
$HIV\text{-}1_{JR-CSF}$	B(美国)	12000	2800	4.2
$HIV\text{-}1_{TH020}$	E(泰国)	4133	93	44
$HIV\text{-}1_{TH021}$	E(泰国)	4967	52	96
$HIV\text{-}1_{TH022}$	E(泰国)	200	15	13
$HIV\text{-}1_{US660}$	B(美国)	2367	127	19
$HIV\text{-}1_{UG031}$	A(乌干达)	1633	71	23
$HIV\text{-}1_{RW009}$	A(卢旺达)	3333	158	21

HIV-1_{RW026}	A(卢旺达)	739	143	5.2
HIV-1_{US727}	B(美国)	14,067	289	49
HIV-1_{US056}	B(美国)	5833	284	21
HIV-1_{LA1}	B(法国)	2.8×10^5	167	1600

[a]HIV-1_{YU-2} 和 HIV-1_{JR-CSF} 用其分子克隆转染获得。其它病毒用感染异源外周血单核细胞制备的非克隆病毒原种粗上清物进行检测。

[b]分化单位按 Myers 等人在 1995 年对 envgene 所作的定义：来源国家是指获取病毒分离物的 HIV 阳性个体的国籍。(World Health Organization Viral Isolate Program)

[c]每毫升的感染单位（IU）指病毒上清稀释物换算成 1 ml 后在每孔中产生的蓝色细胞数目乘以稀释倍数。除 HIV-1_{LAI} 外，所有病毒在不表达 88C 的 HeLa-MAGI 细胞中检测时，感染单位均少于 10 IU/ml。HIV-1_{LAI} 是一种 T 向性病毒株，它在表达和不表达 88C 的 HeLa-MAGI 细胞中检测时，滴度均为 2.8×10^5。

[d]感染力是每 ng $p24^{gag}$ 含有的感染单位（用第 5 列去除第 4 列）。

对 HeLa-MAGI -88C 细胞检测 HIV-2 及其它 SIV 株的能力也进行了测定。有报导说 HIV-2_{Rod} 可用融合素作为辅助受体，甚至在缺少 CD4 时也是如此[Enders 等，《细胞》(Cell) 87(4):745-756(1996)]。HIV-2_{Rod} 可以感染 HeLa-MAGI 细胞。但在 HeLa-MAGI-88C 细胞中，其感染能力至少增强 10 倍（表 4）。HeLa 细胞能内源表达融合素。这样，HIV-2_{Rod} 的分子克隆就具有双相性，不仅能用 CXCR4 作为其辅助受体，还可使用 88C 。与此相似， HIV-2_{7312A} 的一个原代株可感染 HeLa-MAGI -88C 细胞而不能感染 HeLa-MAGI 细胞，说明与 HIV-1 的原代株一样，它也将 88C 用作受体。

表 4

病毒株[a]	参考文献	HeLa-MAGI 上的滴度 (IU/ml)[b]	HeLa-MAGI -88C 上的滴度 (IU/ml)	HeLa-MAGI -88C 上的感染力[c]
HIV-2_{ROD9}	(Guyader 等,1987)	967	5900	13
HIV-2_{7312A}	(Gao 等, 1994)	<30	6500	17

$SIV_{MAC}239$	(Naidu 等,1988)	<30	20900	90
$SIV_{MNE}c18$	(Overbaugh 等,1991)	<30	15700	19
$SIV_{Mne}170$	(Rudensey 等,1995)	<30	10700	27
$SIV_{SM}Pbj1.9$	(Dewhurst 等,1990)	<30	776	ND[d]
$SIV_{AGM}9063$	(Hirsch 等, 1995)	<30	50	<1

[a] HIV-2 原种. $SIV_{SM}Pbj1.9$ 和 $SIV_{AGM}9063$ 用其分子克隆在 293 细胞中转染后直接进行检测. 其它病毒用其分子克隆在 CEMx174 细胞中转染并进行扩增得到.

[b] 每毫升的感染单位（ IU ）指病毒上清稀释物换算成 1 ml 后在每孔中产生的蓝色细胞数目乘以稀释倍数. 这组试验中的所有病毒在 HeLa-MAGI -88-2B 细胞中均为阴性.

[c] 感染力是用 ELISA 测定的每 ng $p27^{gag}$ 含有的感染单位（在表达 88C 的细胞中）.

[d] ND： 未确定.

所有检测了的 SIV 菌株都不能感染 HeLa-MAGI 细胞（表 4 ），也不能感染表达 88-2B 的 HeLa-MAGI 细胞. 这说明 SIV 在 U373 细胞中所用的辅助受体在 HeLa 细胞中不表达，这种受体也不是 88-2B . 所有检测了的 SIV 菌株都能某种程度地感染 HeLa-MAGI-88C 细胞（表 3 ），这说明所有检测了的 SIV 菌株至少将 88C 用作它们的一个辅助受体.

在过去， HIV 的 M 向性和 T 向性菌株分类常常与另一种称呼相关，即分别称为“非合胞体诱导型（ NSI ）”和“合胞体诱导型（ SI ）”. 这里介绍的基于细胞系的试验对合胞体形成很敏感. 受感染的细胞可形成大小不一含有多个核的感染灶. [Kimpton 或 Emerman ， 见上文].

用多种不同的病毒株与 U373-MAGI-88C 或 HeLa-MAGI-88C 所做的实验显示， 这种 SI/NSI 称法是没有意义的， 因为所有病毒株在存在正确的辅助因子时， 都能形成合胞体. 这些实验显示， 合胞体形成更像是标志感染细胞表面存在一个合适辅助受体而不是用来指示相性. 用文献中报导的非合胞体形成 SIV 株， 特别是 $SIV_{MAC}239$ 、 $SIV_{MNE}c18$ 和 $SIV_{MNE}170$ 感染 Hela-MAGI-88 细胞引人注目， 是因为它们在单层细胞中诱导的合胞体比任何其它 HIV 株诱导的合胞体要大得多.

实施例 8

制备能特异性识别 88C 的鼠单克隆抗体。这些抗体用对应于 88C 氨基端 20 个氨基酸的短肽免疫小鼠而产生。按产品说明将短肽与匙孔血红蛋白(KLH)结合(Pierce, Imject maleimide activated KLH), 用福氏完全佐剂乳化, 注射给 5 只小鼠。以三周为间隔, 将结合好的短肽加在福氏不完全佐剂中进行两次辅助注射。在最后一次注射 10 天后, 取这 5 只小鼠的血清用 ELISA 法检测其与 20 氨基酸肽的免疫反应性。另外, 用流式细胞仪(FACS)测血清与 293 细胞表面表达的完整 88C 受体的免疫反应性。抗 88C 活性最高的小鼠选用来进行脾细胞融合, 并按标准方法生产单克隆抗体。建立了 5 个单克隆细胞系(227K 、227M 、 227N 、 227P 、 227R), ELISA 证明它们产生的抗体能识别前面所说的短肽, FACS证明它们产生的抗体可识别293细胞的88C蛋白。每种抗体都只与表达 88C 的 293 细胞反应, 而不能与表达关系密切的 MCP 受体(CCCKR-2)的 293 细胞反应。这些抗体也能识别 COS 细胞中瞬时表达的 88C 。

还制备了抗 88C 的兔多克隆抗体。用前面介绍的方法给两只兔注射结合好的氨基端短肽。并用结合好的氨基端短肽对兔进行四次辅助注射以加强免疫。用表达 88C 的 293 细胞对每只兔的血清(2337J 和 2470J)进行 FACS 检测。这两种血清都能特异性识别 293 细胞表面的 88C 。

检测了上述 5 种单克隆抗体阻断 SIV 感染细胞的能力, SIV 是与 HIV 关系密切的猿猴免疫缺陷病毒[Lehner 等, 《自然医学》(Nature Medicine),2:767 (1996)]。猿猴 $CD4^+$T 细胞在通常情况下对 SIV 感染敏感。在存在 1:5 稀释的抗 88C 单克隆抗体上清的情况下, 将 $CD4^+$T 细胞与 SIV_{mac}32HJ5 克隆一起温育。通过在第 9 天用 RT 检测和定量法(Quan-T-RT 分析试剂盒, Amersham, Arlington Heights, IL)检测反转录酶活性来确定 SIV 的感染。有四种抗体能阻断 SIV 的感染: 抗体 227K 的阻断率为 53%; 抗体 227M 的阻断率为 59%; 抗体 227N 的阻断率为 47%、抗体 227P 的阻断率为 82%. 抗体 227R 不能阻断 SIV 的感染。

这五种抗人 88C 氨基端短肽的单克隆抗体与恒河猴 88C(见 SEQ ID NO;X)的反应能力也进行了检测(恒河猴 88C 与人 88C 在氨基端短肽区域内有两个氨基酸不同)。将人 88C 和恒河猴 88C 的编码区克隆

到表达载体 pcDNA3(Invitrogen)中．将这些表达质粒用 DEAE 法转染 COS 细胞．用空载体作为阴性对照．转染三天后，收集细胞，与五种抗 88C 单克隆抗体一起温育，并进行 FACS 分析．结果表明：五种抗体中有四种（ 227K 、 227M 、 227N 、 227P ）能识别恒河猴 88C ，有一种（ 227R ）不能识别．这五种抗体都能识别转染的人 88C ，且都不与用空载体转染的细胞发生交叉反应。

实施例 9

其它方法也可用来鉴定本发明的趋化因子受体配体和调节剂．

在一个实施方案中，本发明包括配体的直接分析．将可检测的标记待测化合物与携带趋化因子受体功能结构的膜制备物进行作用．例如，用编码一种趋化因子受体的表达载体转染 HEK-293 细胞或组织培养细胞。然后用表达趋化因子受体的转染细胞制备试验用的膜制备物。将膜制备物与 ^{125}I 标记的待测化合物（即趋化因子）作用，在适当的条件下温育（如 37°C 、 10 分钟）。然后用真空抽滤的方法将结合有待测化合物的膜物质收集到滤膜上，洗去未结合的待测化合物。用液闪分光光度计测量滤膜上结合的待测化合物的放射性。待测化合物的特异性可用下面方法进行证明。在加有浓度不断增加的非标记待测化合物情况下重复上述试验，观测受体结合的竞争水平。这些结合试验还可用来鉴定趋化因子受体结合的调节剂。这时可对前述结合试验作如下修改：除标记的待测化合物外，还加入一种可能的调节剂与膜制备物进行作用。膜上标记水平的升高说明这种调节剂是一种激活剂；如果膜上标记水平降低，则说明这种调节剂是趋化因子受体结合活性的抑制剂。

在另一个实施方案中，本发明还包括鉴定受体的配体的间接试验，这种间接试验利用趋化因子受体与 G 蛋白的偶联性来鉴定受体的配体。正如 Linder 等的综述[Linder, 《美国科学》(Sci. Am.), 267:56-65(1992)]所介绍的那样，在信号传导过程中，激活的受体与一种 G 蛋白相互作用并使 G 蛋白活化， G 蛋白通过 GDP 与 GTP 交换而活化。随后 G 蛋白结合的 GTP 水解使 G 蛋白失活．因此检测 G 蛋白的活性试验可通过监测[γ-^{32}P]-GTP 释放 $^{32}P_i$ 来完成．例如，将带有本发明质粒的大约 5 × 10^7 个 HEK-293 细胞在 MEM+10%FCS 中培养。在培养基中补加 5 mCi/ml[^{32}P]-磷酸钠培养 2 小时使细胞内核苷酸库获得标

记。然后用低磷酸等渗缓冲液洗涤细胞。将一份洗涤后的细胞与一种待测化合物作用，另取一份洗涤后细胞不与待测化合物作用，但接受相同的处理。温育一段时间后（如 10 分钟），将细胞离心收集并裂解。以 1M LiCl 作展层剂用薄层层析使核苷酸化合物分离。标记的 GTP 和 GDP 用众知的共展层标准方法来鉴定。然后用本领域标准的放射性自显影技术对标记的 GTP 和 GDP 进行计量。相对高水平的 ^{32}P 标记的 GDP 说明待测化合物是一种配体。这种 GTP 水解试验也可用于鉴定趋化因子受体结合的调节剂。在存在一种可能的调节剂的情况下进行前述试验。GTP 水解相对增加而导致的 ^{32}P 标记 GDP 信号增强说明受体活性相对升高，因此这种信号增强表明该可能的调节剂是一种激活剂。而与之相反，^{32}P 标记 GDP 的信号相对减弱表明受体活性降低。因而说明该可能的调节剂是一种趋化因子受体结合活性的抑制剂。

G 蛋白效应分子（如腺苷酸环化酶、磷脂酶 C 、离子通道和磷酸二脂酶）的活性也可用于试验。用于检测这些效应分子活性的试验在前面已做过介绍。例如，腺苷酸环化酶催化环腺苷酸单磷酸(cAMP)的合成，它可被 G 蛋白活化。配体与一种趋化因子受体结合，会活化一种 G 蛋白，而后者又会活化腺苷酸环化酶。因此通过监测本发明的重组宿主细胞中 cAMP 的水平，就可以检测配体与趋化因子受体的结合。运用本领域众知的合适对照，可以将细胞内 cAMP 水平的升高归因于配体诱导的受体活性升高，从而来鉴定配体。同样，运用本领域众知的对照，可用 cAMP 浓度的相对减少来间接鉴定受体活性的抑制剂。cAMP 的浓度可用商业化的酶联免疫试验进行测量。例如，BioTrak 试剂盒提供竞争免疫试验的试剂。(Amersham, Inc., Arlinton Heights, IL)。按厂商推荐的方法使用这一试剂盒，可设计一个非标记 cAMP 与辣根过氧化物酶结合的 cAMP 的竞争试验。例如非标记的 cAMP 可由表达有本发明的趋化因子受体的活化细胞中获得。这两种化合物竞争性地与一种固定的抗 cAMP 抗体结合。在竞争反应完成后，以四甲基联苯胺/H_2O_2 为底物，用酶法通过检测在 450nm 处有色反应产物的出现，来测量固定的辣根过氧化物酶-cAMP 结合物。运用本领域的标准技术，可用这一结果来计算非标记 cAMP 的水平。除可用于鉴定能与趋化因子受体结合的配体外，cAMP 试验还可用于鉴定趋化因子受体结合的调节剂。使用本发明的重组宿主细胞，除多加一种可能的趋化因子受体活性

的调节剂外，按前面所述的方法进行试验。在使用本领域众知对照的情况下，细胞内 cAMP 水平的相对升高或降低反映了腺苷酸环化酶活性的激活或抑制，而腺苷酸环化酶的活性水平又反映了所研究趋化因子受体的相对活性。趋化因子受体活性水平的相对升高，说明待测调节物是一个激活剂，而趋化因子受体活性水平的相对降低，说明待测调节物是一个趋化因子受体活性的抑制剂。

尽管本发明以具体实施方案的形式进行了叙述，但应当理解本领域的技术人员可对之进行变化和修改。因此，本发明仅受所附权利要求的限定。

序列表

(1)一般信息

(i)申请人： **ICOS Corporation.**

22021 20th Avenue S.E.

Bothell, WA 98201

(ii)发明名称：趋化因子受体的材料与方法

(iii)序列数： **20**

(iv)通讯地址：

(A)联系人： **Marshall, O'Tool, Gerstein, Murry& Borun**

(B)街道： **6300 Sears Tower,233 S. Wacker Drive**

(C)城市： **Chicago**

(D)州： **Illinois**

(E)国家： **USA**

(F)邮政编码： **60606**

(v)计算机可读形式

(A) 介质类型：软盘

(B)计算机： **IBM PC 兼容**

(C)操作系统： **PC-DOS/MS-DOS**

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

(vi)现申请数据：

(A)申请号：

(B)申请日:

(C)分类:

(viii)律师/事务所信息:

(A)姓名: Noland, Greta E.

(B)登记号: 35,302

(C)参考/备案号: 27866/33670

(ix)电讯信息:

(A)电话: 312-474-6300

(B)传真: 312-474-0448

(2)序列 1(SEQ ID NO:1)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 3383 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: cDNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: CDS

(B)位置: 55 … 1110

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88C 多核苷酸和氨基酸序列”

(xi)序列表述: 序列 1(SEQ ID NO:1):

AGAAGAGCTG AGACATCCGT TCCCCTACAA GAAACTCTCC CCGGGTGGAA CAAG ATG 57
Met
1

```
GAT TAT CAA GTG TCA AGT CCA ATC TAT GAC ATC AAT TAT TAT ACA TCG        105
Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr Ser
                5                  10                  15

GAG CCC TGC CAA AAA ATC AAT GTG AAG CAA ATC GCA GCC CGC CTC CTG        153
Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu Leu
            20                  25                  30

CCT CCG CTC TAC TCA CTG GTG TTC ATC TTT GGT TTT GTG GGC AAC ATG        201
Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met
        35                  40                  45

CTG GTC ATC CTC ATC CTG ATA AAC TGC AAA AGG CTG AAG AGC ATG ACT        249
Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met Thr
    50                  55                  60                  65

GAC ATC TAC CTG CTC AAC CTG GCC ATC TCT GAC CTG TTT TTC CTT CTT        297
Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu Leu
                70                  75                  80

ACT GTC CCC TTC TGG GCT CAC TAT GCT GCC GCC CAG TGG GAC TTT GGA        345
Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe Gly
            85                  90                  95

AAT ACA ATG TGT CAA CTC TTG ACA GGG CTC TAT TTT ATA GGC TTC TTC        393
Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe Phe
        100                 105                 110

TCT GGA ATC TTC TTC ATC ATC CTC CTG ACA ATC GAT AGG TAC CTG GCT        441
Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala
    115                 120                 125

GTC GTC CAT GCT GTG TTT GCT TTA AAA GCC AGG ACG GTC ACC TTT GGG        489
Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly
130                 135                 140                 145

GTG GTG ACA AGT GTG ATC ACT TGG GTG GTG GCT GTG TTT GCG TCT CTC        537
Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser Leu
                150                 155                 160

CCA GGA ATC ATC TTT ACC AGA TCT CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC        585
Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr Thr
            165                 170                 175

TGC AGC TCT CAT TTT CCA TAC AGT CAG TAT CAA TTC TGG AAG AAT TTC        633
Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn Phe
        180                 185                 190

CAG ACA TTA AAG ATA GTC ATC TTG GGG CTG GTC CTG CCG CTG CTT GTC        681
Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Val
    195                 200                 205

ATG GTC ATC TGC TAC TCG GGA ATC CTA AAA ACT CTG CTT CGG TGT CGA        729
Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg
210                 215                 220                 225

AAT GAG AAG AAG AGG CAC AGG GCT GTG AGG CTT ATC TTC ACC ATC ATG        777
Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile Met
                230                 235                 240

ATT GTT TAT TTT CTC TTC TGG GCT CCC TAC AAC ATT GTC CTT CTC CTG        825
Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu Leu
            245                 250                 255

AAC ACC TTC CAG GAA TTC TTT GGC CTG AAT AAT TGC AGT AGC TCT AAC        873
Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser Asn
        260                 265                 270
```

```
AGG TTG GAC CAA GCT ATG CAG GTG ACA GAG ACT CTT GGG ATG ACG CAC        921
Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His
    275                 280                 285

TGC TGC ATC AAC CCC ATC ATC TAT GCC TTT GTC GGG GAG AAG TTC AGA        969
Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg
290                 295                 300                 305

AAC TAC CTC TTA GTC TTC TTC CAA AAG CAC ATT GCC AAA CGC TTC TGC       1017
Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe Cys
                310                 315                 320

AAA TGC TGT TCT ATT TTC CAG CAA GAG GCT CCC GAG CGA GCA AGC TCA       1065
Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser Ser
            325                 330                 335

GTT TAC ACC CGA TCC ACT GGG GAG CAG GAA ATA TCT GTG GGC TTG           1113
Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
        340                 345                 350

TGACACGGAC TCAAGTGGGC TGGTGACCCA GTCAGAGTTG TGCACATGGC TTAGTTTTCA     1173

TACACAGCCT GGGCTGGGGG TGGGGTGGGA GAGGTCTTTT TTAAAAGGAA GTTACTGTTA     1233

TAGAGGGTCT AAGATTCATC CATTTATTTG GCATCTGTTT AAAGTAGATT AGATCTTTTA     1293

AGCCCATCAA TTATAGAAAG CCAAATCAAA ATATGTTGAT GAAAAATAGC AACCTTTTTA     1353

TCTCCCCTTC ACATGCATCA AGTTATTGAC AAACTCTCCC TTCACTCCGA AAGTTCCTTA     1413

TGTATATTTA AAAGAAAGCC TCAGAGAATT GCTGATTCTT GAGTTTAGTG ATCTGAACAG     1473

AAATACCAAA ATTATTTCAG AAATGTACAA CTTTTTACCT AGTACAAGGC AACATATAGG     1533

TTGTAAATGT GTTTAAAACA GGTCTTTGTC TTGCTATGGG GAGAAAAGAC ATGAATATGA     1593

TTAGTAAAGA AATGACACTT TTCATGTGTG ATTTCCCCTC CAAGGTATGG TTAATAAGTT     1653

TCACTGACTT AGAACCAGGC GAGAGACTTG TGGCCTGGGA GAGCTGGGGA AGCTTCTTAA     1713

ATGAGAAGGA ATTTGAGTTG GATCATCTAT TGCTGGCAAA GACAGAAGCC TCACTGCAAG     1773

CACTGCATGG GCAAGCTTGG CTGTAGAAGG AGACAGAGCT GGTTGGGAAG ACATGGGGAG     1833

GAAGGACAAG GCTAGATCAT GAAGAACCTT GACGGCATTG CTCCGTCTAA GTCATGAGCT     1893

GAGCAGGGAG ATCCTGGTTG GTGTTGCAGA AGGTTTACTC TGTGGCCAAA GGAGGGTCAG     1953

GAAGGATGAG CATTTAGGGC AAGGAGACCA CCAACAGCCC TCAGGTCAGG GTGAGGATGG     2013

CCTCTGCTAA GCTCAAGGCG TGAGGATGGG AAGGAGGGAG GTATTCGTAA GGATGGGAAG     2073

GAGGGAGGTA TTCGTGCAGC ATATGAGGAT GCAGAGTCAG CAGAACTGGG GTGGATTTGG     2133

TTTGGAAGTG AGGGTCAGAG AGGAGTCAGA GAGAATCCCT AGTCTTCAAG CAGATTGGAG     2193

AAACCCTTGA AAAGACATCA AGCACAGAAG GAGGAGGAGG AGGTTTAGGT CAAGAAGAAG     2253

ATGGATTGGT GTAAAAGGAT GGGTCTGGTT TGCAGAGCTT GAACACAGTC TCACCCAGAC     2313

TCCAGGCTGT CTTTCACTGA ATGCTTCTGA CTTCATAGAT TTCCTTCCCA TCCCAGCTGA     2373

AATACTGAGG GGTCTCCAGG AGGAGACTAG ATTTATGAAT ACACGAGGTA TGAGGTCTAG     2433

GAACATACTT CAGCTCACAC ATGAGATCTA GGTGAGGATT GATTACCTAG TAGTCATTTC     2493

ATGGGTTGTT GGGAGGATTC TATGAGGCAA CCACAGGCAG CATTTAGCAC ATACTACACA     2553
```

TTCAATAAGC ATCAAACTCT TAGTTACTCA TTCAGGGATA GCACTGAGCA AAGCATTGAG 2610

CAAAGGGGTC CCATATAGGT GAGGGAAGCC TGAAAAACTA AGATGCTGCC TGCCCAGTGC 2670

ACACAAGTGT AGGTATCATT TTCTGCATTT AACCGTCAAT AGGCAAAGGG GGGAAGGGAC 2730

ATATTCATTT GGAAATAAGC TGCCTTGAGC CTTAAAACCC ACAAAAGTAC AATTTACCAG 2790

CCTCCGTATT TCAGACTGAA TGGGGGTGGG GGGGGCGCCT TAGGTACTTA TTCCAGATGC 2850

CTTCTCCAGA CAAACCAGAA GCAACAGAAA AAATCGTCTC TCCCTCCCTT TGAAATGAAT 2910

ATACCCCTTA GTGTTTGGGT ATATTCATTT CAAAGGGAGA GAGAGAGGTT TTTTTCTGTT 2970

CTTTCTCATA TGATTGTGCA CATACTTGAG ACTGTTTTGA ATTTGGGGGA TGGCTAAAAC 3030

CATCATAGTA CAGGTAAGGT GAGGGAATAG TAAGTGGTGA GAACTACTCA GGGAATGAAG 3090

GTGTCAGAAT AATAAGAGGT GCTACTGACT TTCTCAGCCT CTGAATATGA ACGGTGAGCA 3150

TTGTGGCTGT CAGCAGGAAG CAACGAAGGG AAATGTCTTT CCTTTTGCTC TTAAGTTGTG 3210

GAGAGTGCAA CAGTAGCATA GGACCCTACC CTCTGGGCCA AGTCAAAGAC ATTCTGACAT 3270

CTTAGTATTT GCATATTCTT ATGTATGTGA AAGTTACAAA TTGCTTGAAA GAAAATATGC 3330

ATCTAATAAA AAACACCTTC TAAAATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 3383

(2)序列 2（SEQ ID NO：2）的信息:

（i）序列特征:

（A）长度: 352 个氨基酸

（B）类型: 氨基酸

（D）拓朴构型: 线型

（ii）分子类型: 蛋白质

（ix）特征:

（A）名称/关键: misc-特征

（B）其它信息: /= "88C 氨基酸序列"

（xi）序列表述: 序列 2（SEQ ID NO：2）:

```
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
 1               5                  10                  15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
            20                  25                  30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
        35                  40                  45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
    50                  55                  60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
                85                  90                  95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
            100                 105                 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
        115                 120                 125
```

```
Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
    130                 135                 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145                 150                 155                 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
                165                 170                 175

Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
            180                 185                 190

Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
        195                 200                 205

Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
    210                 215                 220

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225                 230                 235                 240

Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
                245                 250                 255

Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
            260                 265                 270

Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
        275                 280                 285

His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
    290                 295                 300

Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305                 310                 315                 320

Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
                325                 330                 335

Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
            340                 345                 350
```

（2）序列3（SEQ ID NO：3）的信息：

（I）序列特征：

（A）长度：1915碱基对

（B）类型：核酸

（C）链型：单链

（D）拓朴构型：线型

（ii）分子类型：cDNA

（ix）特征：

（A）名称/关键：CDS

（B）位置：362…1426

（ix）特征：

（A）名称/关键：misc－特征

（B）其它信息：/="88－2B多核苷酸和氨基酸序列"

（xi）序列表述：序列3（SEQ ID NO：3）：

```
ATAATAATGA TTATTATATT GTTATCATTA TCTAGCCTGT TTTTTCCTGT TTTGTATTTC      60

TTCCTTTAAA TGCTTTCAGA AATCTGTATC CCCATTCTTC ACCACCACCC CACAACATTT     120
```

```
CTGCTTCTTT TCCCATGCCG GTCATGCTA ACTTTGAAAG CTTCAGCTCT TTCCTTCCTC      180

AATCCTTTTC CTGGCACCTC TGATATGCCT TTTGAAATTC ATGTTAAAGA ATCCCTAGGC      240

TGCTATCACA TGTGGCATCT TTGTTGAGTA CATGAATAAA TCAACTGGTG TGTTTTACGA      300

AGGATGATTA TGCTTCATTG TGGGATTGTA TTTTTCTTCT TCTATCACAG GGAGAAGTGA      360

A ATG ACA ACC TCA CTA GAT ACA GTT GAG ACC TTT GGT ACC ACA TCC           406
  Met Thr Thr Ser Leu Asp Thr Val Glu Thr Phe Gly Thr Thr Ser
    1               5                  10                  15

TAC TAT GAT GAC GTG GGC CTG CTC TGT GAA AAA GCT GAT ACC AGA GCA        454
Tyr Tyr Asp Asp Val Gly Leu Leu Cys Glu Lys Ala Asp Thr Arg Ala
                20                  25                  30

CTG ATG GCC CAG TTT GTG CCC CCG CTG TAC TCC CTG GTG TTC ACT GTG        502
Leu Met Ala Gln Phe Val Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Thr Val
            35                  40                  45

GGC CTC TTG GGC AAT GTG GTG GTG GTG ATG ATC CTC ATA AAA TAC AGG        550
Gly Leu Leu Gly Asn Val Val Val Val Met Ile Leu Ile Lys Tyr Arg
        50                  55                  60

AGG CTC CGA ATT ATG ACC AAC ATC TAC CTG CTC AAC CTG GCC ATT TCG        598
Arg Leu Arg Ile Met Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser
    65                  70                  75

GAC CTG CTC TTC CTC GTC ACC CTT CCA TTC TGG ATC CAC TAT GTC AGG        646
Asp Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg
80                  85                  90                  95

GGG CAT AAC TGG GTT TTT GGC CAT GGC ATG TGT AAG CTC CTC TCA GGG        694
Gly His Asn Trp Val Phe Gly His Gly Met Cys Lys Leu Leu Ser Gly
                100                 105                 110

TTT TAT CAC ACA GGC TTG TAC AGC GAG ATC TTT TTC ATA ATC CTG CTG        742
Phe Tyr His Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu
            115                 120                 125

ACA ATC GAC AGG TAC CTG GCC ATT GTC CAT GCT GTG TTT GCC CTT CGA        790
Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg
        130                 135                 140

GCC CGG ACT GTC ACT TTT GGT GTC ATC ACC AGC ATC GTC ACC TGG GGC        838
Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly
    145                 150                 155

CTG GCA GTG CTA GCA GCT CTT CCT GAA TTT ATC TTC TAT GAG ACT GAA        886
Leu Ala Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu
160                 165                 170                 175

GAG TTG TTT GAA GAG ACT CTT TGC AGT GCT CTT TAC CCA GAG GAT ACA        934
Glu Leu Phe Glu Glu Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Pro Glu Asp Thr
                180                 185                 190

GTA TAT AGC TGG AGG CAT TTC CAC ACT CTG AGA ATG ACC ATC TTC TGT        982
Val Tyr Ser Trp Arg His Phe His Thr Leu Arg Met Thr Ile Phe Cys
            195                 200                 205

CTC GTT CTC CCT CTG CTC GTT ATG GCC ATC TGC TAC ACA GGA ATC ATC       1030
Leu Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile
        210                 215                 220

AAA ACG CTG CTG AGG TGC CCC AGT AAA AAA AAG TAC AAG GCC ATC CGG       1078
Lys Thr Leu Leu Arg Cys Pro Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Ala Ile Arg
    225                 230                 235
```

```
CTC ATT TTT GTC ATC ATG GCG GTG TTT TTC ATT TTC TGG ACA CCC TAC      1126
Leu Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr
240                 245                 250                 255

AAT GTG GCT ATC CTT CTC TCT TCC TAT CAA TCC ATC TTA TTT GGA AAT      1174
Asn Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Ile Leu Phe Gly Asn
                260                 265                 270

GAC TGT GAG CGG AGC AAG CAT CTG GAC CTG GTC ATG CTG GTG ACA GAG      1222
Asp Cys Glu Arg Ser Lys His Leu Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu
            275                 280                 285

GTG ATC GCC TAC TCC CAC TGC TGC ATG AAC CCG GTG ATC TAC GCC TTT      1270
Val Ile Ala Tyr Ser His Cys Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe
        290                 295                 300

GTT GGA GAG AGG TTC CGG AAG TAC CTG CGC CAC TTC TTC CAC AGG CAC      1318
Val Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg His Phe Phe His Arg His
    305                 310                 315

TTG CTC ATG CAC CTG GGC AGA TAC ATC CCA TTC CTT CCT AGT GAG AAG      1366
Leu Leu Met His Leu Gly Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Pro Ser Glu Lys
320                 325                 330                 335

CTG GAA AGA ACC AGC TCT GTC TCT CCA TCC ACA GCA GAG CCG GAA CTC      1414
Leu Glu Arg Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Glu Pro Glu Leu
                340                 345                 350

TCT ATT GTG TTT TAGGTCAGAT GCAGAAAATT GCCTAAAGAG GAAGGACCAA         1466
Ser Ile Val Phe
            355

GGAGATGAAG CAAACACATT AAGCCTTCCA CACTCACCTC TAAAACAGTC CTTCAAACTT    1526

CCAGTGCAAC ACTGAAGCTC TTGAAGACAC TGAAATATAC ACACAGCAGT AGCAGTAGAT    1586

GCATGTACCC TAAGGTCATT ACCACAGGCC AGGGGCTGGG CAGCGTACTC ATCATCAACC    1646

CTAAAAAGCA GAGCTTTGCT TCTCTCTCTA AAATGAGTTA CCTACATTTT AATGCACCTG    1706

AATGTTAGAT AGTTACTATA TGCCGCTACA AAAAGGTAAA ACTTTTTATA TTTTATACAT    1766

TAACTTCAGC CAGCTATTGA TATAAATAAA ACATTTTCAC ACAATACAAT AAGTTAACTA    1826

TTTTATTTTC TAATGTGCCT AGTTCTTTCC CTGCTTAATG AAAAGCTTGT TTTTTCAGTG    1886

TGAATAAATA ATCGTAAGCA ACAAAAAAA                                      1915
```

（2）序列4（SEQ ID NO：4）的信息：

（I）序列特征：

（A）长度：355个氨基酸

（B）类型：氨基酸

（D）拓扑构型：线型

（ii）分子类型：蛋白质

（ix）特征：

（A）名称/关键：misc-特征

（B）其它信息：/="88-2B氨基酸序列"

（xi）序列表述：序列4（SEQ ID NO：4）：

```
Met Thr Thr Ser Leu Asp Thr Val Glu Thr Phe Gly Thr Thr Ser Tyr
 1               5                  10                  15
```

```
Tyr Asp Asp Val Gly Leu Leu Cys Glu Lys Ala Asp Thr Arg Ala Leu
            20                  25                  30

Met Ala Gln Phe Val Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Thr Val Gly
        35                  40                  45

Leu Leu Gly Asn Val Val Val Val Met Ile Leu Ile Lys Tyr Arg Arg
    50                  55                  60

Leu Arg Ile Met Thr Asn Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp
65                  70                  75                  80

Leu Leu Phe Leu Val Thr Leu Pro Phe Trp Ile His Tyr Val Arg Gly
                85                  90                  95

His Asn Trp Val Phe Gly His Gly Met Cys Lys Leu Leu Ser Gly Phe
            100                 105                 110

Tyr His Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
        115                 120                 125

Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Arg Ala
    130                 135                 140

Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Ile Thr Ser Ile Val Thr Trp Gly Leu
145                 150                 155                 160

Ala Val Leu Ala Ala Leu Pro Glu Phe Ile Phe Tyr Glu Thr Glu Glu
                165                 170                 175

Leu Phe Glu Glu Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Pro Glu Asp Thr Val
            180                 185                 190

Tyr Ser Trp Arg His Phe His Thr Leu Arg Met Thr Ile Phe Cys Leu
        195                 200                 205

Val Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Ile Ile Lys
    210                 215                 220

Thr Leu Leu Arg Cys Pro Ser Lys Lys Lys Tyr Lys Ala Ile Arg Leu
225                 230                 235                 240

Ile Phe Val Ile Met Ala Val Phe Phe Ile Phe Trp Thr Pro Tyr Asn
                245                 250                 255

Val Ala Ile Leu Leu Ser Ser Tyr Gln Ser Ile Leu Phe Gly Asn Asp
            260                 265                 270

Cys Glu Arg Ser Lys His Leu Asp Leu Val Met Leu Val Thr Glu Val
        275                 280                 285

Ile Ala Tyr Ser His Cys Cys Met Asn Pro Val Ile Tyr Ala Phe Val
    290                 295                 300

Gly Glu Arg Phe Arg Lys Tyr Leu Arg His Phe Phe His Arg His Leu
305                 310                 315                 320

Leu Met His Leu Gly Arg Tyr Ile Pro Phe Leu Pro Ser Glu Lys Leu
                325                 330                 335

Glu Arg Thr Ser Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Glu Pro Glu Leu Ser
            340                 345                 350

Ile Val Phe
        355
```

(2)序列 5(SEQ ID NO:5)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 34 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ V28degf2 ”

(xi)序列表述: 序列 5(SEQ ID NO:5):

GACGGATCCA TYGAYAGRTA CCTGGCYATY GTCC

(2)序列 6(SEQ ID NO:6)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 32 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ V28degr2 ”

(xi)序列表述: 序列 6(SEQ ID NO:6):

GCTAAGCTTT TRTAGGGDGT CCAYAAGAGY AA

(2)序列 7(SEQ ID NO:7)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88c-r4 ”

(xi)序列表述: 序列 7(SEQ ID NO:7):

GATAAGCCTC ACAGCCCTGT G

(2)序列 8(SEQ ID NO:8)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 28 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88c-r1b ”

(xi)序列表述: 序列 8(SEQ ID NO:8):

GCTAAGCTTG TGACTATCT TTAATGTC

(2)序列 9(SEQ ID NO:9)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88-2B-3 ”

(xi)序列表述: 序列 9(SEQ ID NO:9):

CCCTCTAGAC TAAAACACAA TAGAGAG

(2)序列 10(SEQ ID NO:10)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 30 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88-2B-5 ”

(xi)序列表述: 序列 10(SEQ ID NO:10):

GCTAAGCTTA TCACAGGGAG AAGTGAAATG

(2)序列 11(SEQ ID NO:11)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 20 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88-2B-f1 ”

(xi)序列表述: 序列 11(SEQ ID NO:11):

AGTGCTAGCA GCTCTTCCTG

(2)序列 12(SEQ ID NO:12)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 20 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88-2B-r1 ”

(xi)序列表述: 序列 12(SEQ ID NO:12):

CAGCAGCGTT TTGATGATTC

(2)序列 13(SEQ ID NO:13)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 19 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88C-f1 ”

(xi)序列表述: 序列 13(SEQ ID NO:13):

TGTGTTTGCT TTAAAAGCC

(2)序列 14(SEQ ID NO:14)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 17 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ 88C-r3 ”

(xi)序列表述: 序列 14(SEQ ID NO:14):

TAAGCCTCAC AGCCCTG

(2)序列 15(SEQ ID NO:15)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 28 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ CCCKR1(2)-5 引物”

(xi)序列表述: 序列 15(SEQ ID NO:15):

CGTAAGCTTA GAGAAGCCGG GATGGGAA

(2)序列 16(SEQ ID NO:16)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA

(iv)反义链: 是

(ix)特征:

(A)名称/关键: misc-特征

(B)其它信息: /=“ CCCKR1-3 引物”

(xi)序列表述: 序列 16(SEQ ID NO:16):

GCCTCTAGAG TCAGAGACCA GCAGA

(2)序列 17(SEQ ID NO:17)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 28 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(xi)序列表述: 序列 17(SEQ ID NO:17):

GACAAGCTTC ACAGGGTGGA ACAAGATG

(2)序列 18(SEQ ID NO:18)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: DNA（基因组）

(xi)序列表述: 序列 18(SEQ ID NO:18):

GTCTCTAGAC CACTTGAGTC CGTGTCA

(2)序列 19(SEQ ID NO:19)信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 1059 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: cDNA

(ix)特征:

(A)名称/关键: CDS

(B)位置: 1 … 1056

(xi)序列表述: 序列 19(SEQ ID NO:19):

```
ATG GAC TAT CAA GTG TCA AGT CCA ACC TAT GAC ATC GAT TAT TAT ACA          48
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Thr Tyr Asp Ile Asp Tyr Tyr Thr
 1               5                  10                  15

TCG GAA CCC TGC CAA AAA ATC AAT GTG AAA CAA ATC GCA GCC CGC CTC          96
Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
            20                  25                  30

CTG CCT CCG CTC TAC TCA CTG GTG TTC ATC TTT GGT TTT GTG GGC AAC         144
Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
        35                  40                  45

ATA CTG GTC GTC CTC ATC CTG ATA AAC TGC AAA AGG CTG AAA AGC ATG         192
Ile Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
    50                  55                  60

ACT GAC ATC TAC CTG CTC AAC CTG GCC ATC TCT GAC CTG CTT TTC CTT         240
Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80

CTT ACT GTC CCC TTC TGG GCT CAC TAT GCT GCT GCC CAG TGG GAC TTT         288
Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
                85                  90                  95

GGA AAT ACA ATG TGT CAA CTC TTG ACA GGG CTC TAT TTT ATA GGC TTC         336
Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
            100                 105                 110

TTC TCT GGA ATC TTC TTC ATC ATC CTC CTG ACA ATC GAT AGG TAC CTG         384
Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
        115                 120                 125

GCT ATC GTC CAT GCT GTG TTT GCT TTA AAA GCC AGG ACA GTC ACC TTT         432
Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
    130                 135                 140

GGG GTG GTG ACA AGT GTG ATC ACT TGG GTG GTG GCT GTG TTT GCC TCT         480
Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145                 150                 155                 160

CTC CCA GGA ATC ATC TTT ACC AGA TCT CAG AGA GAA GGT CTT CAT TAC         528
Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Arg Glu Gly Leu His Tyr
                165                 170                 175

ACC TGC AGC TCT CAT TTT CCA TAC AGT CAG TAT CAA TTC TGG AAG AAT         576
Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
            180                 185                 190

TTT CAG ACA TTA AAG ATG GTC ATC TTG GGG CTG GTC CTG CCG CTG CTT         624
Phe Gln Thr Leu Lys Met Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
        195                 200                 205

GTC ATG GTC ATC TGC TAC TCG GGA ATC CTG AAA ACT CTG CTT CGG TGT         672
Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
    210                 215                 220

CGA AAC GAG AAG AAG AGG CAC AGG GCT GTG AGG CTT ATC TTC ACC ATC         720
Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225                 230                 235                 240

ATG ATT GTT TAT TTT CTC TTG TGG GCT CCC TAC AAC ATT GTC CTT CTC         768
Met Ile Val Tyr Phe Leu Leu Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
                245                 250                 255

CTG AAC ACC TTC CAG GAA TTC TTT GGC CTG AAT AAT TGC AGT AGC TCT         816
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
            260                 265                 270
```

```
AAC AGG TTG GAC CAA GCC ATG CAG GTG ACA GAG ACT CTT GGG ATG ACA        864
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
        275                 280                 285

CAC TGC TGC ATC AAC CCC ATC ATC TAT GCC TTT GTC GGG GAG AAG TTC        912
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
    290                 295                 300

AGA AAC TAC CTC TTA GTC TTC TTC CAA AAG CAC ATT GCC AAA CGC TTC        960
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305                 310                 315                 320

TGC AAA TGC TGT TCC ATT TTC CAG CAA GAG GCT CCC GAG CGA GCA AGT       1008
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
                325                 330                 335

TCA GTT TAC ACC CGA TCC ACT GGG GAG CAG GAA ATA TCT GTG GGC TTG       1056
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
            340                 345                 350

TGA                                                                  1059
```

(2)序列 20 (SEQ ID NO: 20)的信息:

(I)序列特征:

(A)长度: 352 氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑构型: 线型

(ii)分子类型: 蛋白质

(xi)序列表述: 序列 20 (SEQ ID NO: 20):

```
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Thr Tyr Asp Ile Asp Tyr Tyr Thr
 1               5                  10                  15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
            20                  25                  30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
        35                  40                  45

Ile Leu Val Val Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
    50                  55                  60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
                85                  90                  95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
            100                 105                 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
        115                 120                 125

Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
    130                 135                 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145                 150                 155                 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Arg Glu Gly Leu His Tyr
                165                 170                 175
```

```
Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
            180                 185                 190

Phe Gln Thr Leu Lys Met Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
        195                 200                 205

Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
    210                 215                 220

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225                 230                 235                 240

Met Ile Val Tyr Phe Leu Leu Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
                245                 250                 255

Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
            260                 265                 270

Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
        275                 280                 285

His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
    290                 295                 300

Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305                 310                 315                 320

Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
                325                 330                 335

Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
            340                 345                 350
```