

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01813859.4

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年4月18日

[11] 授权公告号 CN 1310942C

[51] Int. Cl. (续)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2001.8.6 [21] 申请号 01813859.4

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 4 [33] GB [31] 0019018.1

[32] 2000.12. 8 [33] GB [31] 0029996.6

[32] 2001. 5.26 [33] GB [31] 0112890.9

[86] 国际申请 PCT/GB2001/003524 2001.8.6

[87] 国际公布 WO2002/012325 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.8

[73] 专利权人 路德维希癌症研究院

地址 瑞士苏黎世

[72] 发明人 卢欣

[56] 参考文献

WO0032628A 2000.6.8

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

权利要求书 4 页 说明书 69 页 附图 48 页

[54] 发明名称

校正基因

[57] 摘要

本发明涉及一个肿瘤抑制基因家族的新成员(凋亡刺激蛋白, ASP)的鉴定, 该基因编码可调节 p53 活性的多肽, 以及可调节所述肿瘤抑制多肽活性的多肽。

1. 检测分离的组织样品中是否存在多肽的方法，所述多肽是 p53 细胞凋亡活性的抑制剂，其中所述多肽由选自下列的核酸分子编码：
- 5 i) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的 DNA 分子；
- ii) 在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交并编码 p53 细胞凋亡活性抑制剂的 DNA 分子；以及
- iii) 为(i)和(ii)中所述 DNA 序列的遗传密码子简并序列的 DNA 分子，其中所述检测法包括以下步骤：提供受检测的分离的组织样品；提供适于用试剂检测所述多肽的条件；以及用所述试剂检测所述多肽的存在。
- 10 2. 根据权利要求 1 的检测方法，其中所述的组织样品是乳腺组织。
- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 的检测方法，其中所述的试剂是抗体。
4. 根据权利要求 3 的检测方法，其中该方法是免疫测定。
5. 检测分离的乳腺组织样品中是否存在核酸分子的方法，所述核酸编码 p53 细胞凋亡活性的抑制剂，其中所述分子选自下列核酸分子：
- 20 i) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的核酸分子；
- ii) 在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交并编码 p53 细胞凋亡活性抑制剂的核酸分子；以及
- iii) 为(i)和(ii)中所述序列的遗传密码子简并序列的核酸分子；
- 25 其中所述检测法包括以下步骤：提供受检测的分离的样品；提供适于用所述试剂检测所述核酸分子的条件；以及用所述试剂检测所述核酸分子的存在。
6. 根据权利要求 5 的检测方法，其中试剂是能与所述核酸序列杂交的核酸分子。
- 30

7. 根据权利要求6的检测方法，其中核酸是至少一种寡核苷酸。

8. 根据权利要求6或7的检测方法，其中检测方法是聚合酶链反应
5 检测法。

9. 能与 SEQ ID NO:4 所示多肽结合的抗体用于制备通过诱导细胞凋
亡以治疗癌症的药物的用途。

10 10. 根据权利要求9的抗体用途，其中癌症是乳腺癌。

11. 反义核酸分子用于制备通过诱导细胞凋亡以治疗癌症的药物的
用途，所述反义核酸分子含有选自下列的有义序列的反义序列：

i) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的核酸分子；

15 ii) 由在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交的序列组成的核酸分
子；以及

iii) 由(i)和(ii)中所述序列的遗传密码子简并序列组成的核酸分子。

12. 用于鉴定具有细胞生长抑制活性的试剂的筛选方法，它包括：

20 i) 提供由选自下列的核酸分子所编码的多肽：

a) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的 DNA 分子；

b) 在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交并编码 p53 细胞凋亡活
性抑制剂的 DNA 分子；以及

25 c) 为(a)和(b)中所述 DNA 序列的遗传密码子简并序列的 DNA 分
子；

ii) 提供至少一种候选试剂；

iii) 提供一种由 i) 和 ii) 混合形成的配制品；

iv) 检测或测量所述试剂的细胞生长抑制活性；或者任选地

v) 检测试剂对于选择的细胞种类的生长和/或细胞分裂的效果。

30

13. 根据权利要求 12 的方法，其中所述的多肽由 SEQ ID NO:3 所示的核酸序列编码。

14. 根据权利要求 12 或 13 的方法，其中所述多肽由细胞表达。

5

15. 根据权利要求 14 的方法，其中所述细胞是癌细胞。

16. 根据权利要求 12 或 13 的方法，其中所述多肽被过量表达。

10 17. 根据权利要求 14 求的方法，其中所述多肽被过量表达。

18. 根据权利要求 15 的方法，其中所述多肽被过量表达。

15 19. 根据权利要求 14 的方法，其中所述细胞被编码所述多肽的核酸分子转化/转染。

20. 根据权利要求 15 的方法，其中所述细胞被编码所述多肽的核酸分子转化/转染。

20 21. 一种组合药物制剂，它包含至少一种有义序列的反义核酸分子和一种化疗剂，其中有义序列选自：

i) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的核酸分子；

ii) 由在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交的序列组成的核酸分子；以及

25 iii) 由(i)和(ii)中所述 DNA 序列的遗传密码子简并序列组成的核酸分子。

22. 根据权利要求 21 所述的制剂，其中所述的化疗剂是一种抗癌制剂，它选自：顺铂、铂黑、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、卡氮芥、氮甲叶酸、5-氟二氧嘧啶、阿糖胞苷 (cytarabine)、巯基嘌呤、柔毛霉素、阿霉

30

素、外茜草素 (epirubicin)、长春碱、长春新碱、更生霉素、丝裂霉素 C、红豆杉醇、L-天冬酰胺酶、粒细胞集落刺激因子、单烯双炔 (enediyne)、苯丁酸氮芥、ARC-C、长春地辛 (vindesine)、博来霉素、或表鬼白毒吡喃葡萄糖苷。

5

23. 根据权利要求 22 的制剂，其中所述化疗剂是顺铂。

24. 根据权利要求 22 所述的制剂，其中所述的单烯双炔是杯形生长抑制素 (chaliceamicin) 或望菌生长抑制素 (esperamicin)。

10

25. 一种组合药物制剂，它包含能与选自下列的核酸分子所编码的多肽结合的抗体和一种化疗剂：

i) 由 SEQ ID NO:3 所示序列组成的核酸分子；

ii) 由在严格杂交条件下与 SEQ ID NO:3 杂交的序列组成的核酸分子；以及

15

iii) 由(i)和(ii)中所述 DNA 序列的遗传密码子简并序列组成的核酸分子。

20

26. 根据权利要求 25 所述的制剂，其中所述的化疗剂选自：顺氯铂、铂黑、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、卡氮芥、氮甲叶酸、5-氟二氧嘧啶、阿糖胞苷 (cytarabine)、巯基嘌呤、柔毛霉素、阿霉素、外茜草素 (epirubicin)、长春碱、长春新碱、更生霉素、丝裂霉素 C、红豆杉醇、L-天冬酰胺酶、粒细胞集落刺激因子、单烯双炔 (enediyne)、苯丁酸氮芥、ARC-C、长春地辛 (vindesine)、博来霉素、或表鬼白毒吡喃葡萄糖苷。

25

27. 根据权利要求 26 的制剂，其中所述化疗剂是顺铂。

28. 根据权利要求 26 所述的制剂，其中所述的单烯双炔是杯形生长抑制素 (chaliceamicin) 或望菌生长抑制素 (esperamicin)。

校正基因

5 本发明涉及一个肿瘤抑制基因家族的新成员（凋亡刺激蛋白，ASP）的鉴定，该基因编码可调节 p53 活性的多肽，以及可调节所述肿瘤抑制多肽活性的多肽。

10 肿瘤抑制基因编码抑制细胞生长或分裂的蛋白质，因此对于维持正常细胞的增殖、生长和分化非常重要。在当例如 DNA 受到损伤时，肿瘤抑制基因的突变导致异常的细胞周期进程，由此，阻止细胞周期的正常细胞周期的检查点被丢失，受损细胞的分裂难以控制。肿瘤抑制基因的产物作用于细胞的各个部位（如细胞表面、细胞质、核），来阻断受损细胞的通过细胞循环通路（即 G1, S, G2, M 和 cytokinesis）。

15 许多的肿瘤抑制基因已经被分离并测序。它们包括，在此仅例，视网膜母细胞瘤基因（Rb），该基因的突变已经与某些癌症建立其联系，如骨癌（osteocarcoma）、膀胱癌、小细胞肺癌、乳腺癌，视网膜母细胞瘤，以及维耳姆斯瘤-1 基因（WT-1），该基因的突变还与肾胚细胞瘤和神经纤维瘤建立起联系。

20 肿瘤抑制基因家族，MAD（Mothers against *dpp*（decapentapelic 基因））和 MADR（MAD 相关基因）已经在许多物种中得到鉴定。这些基因编码丝氨酸/苏氨酸受体信号传输中所必须的涉及信号传导通路的蛋白质。MADR1 是 *dpp* 通路信号传输中必须的。MADR2 是另一个 MADR，该基因的突变已经与结肠癌联系起来（6%的散发性结肠癌）。MADR2 基因序列，即已知的 Smad2，在 WO98/07849 中已经被公开了。

25 目前关于肿瘤抑制基因的一个最为热点的研究是 p53。p53 编码的蛋白质作为转录因子是一个细胞分裂周期的关键的调节因子。它是 1978 年被发现的（Lane 和 Crawford, 1999），该蛋白质显示与 SV40 大 T 抗原的结合亲和力。p53 基因编码一个分子量为 53kDa 的含 393 个氨基酸的多肽。

30 由 p53 的转录活性调节的基因包含了一个位于 5'端的 p53 识别序列。

这些基因在某些情况下被激活,例如由于DNA受损导致p53在细胞水平增加时。响应p53的基因包括了mdm2(Momand等,1992),Bax(Miyashita和Reed,1995)以及PIG-3(Polyak et al,1997)。Bax和PIG-3涉及到p53的一个最重要的功能,即诱导凋亡。凋亡或程序化的细胞死亡是一个清除受损细胞的自然过程。它对于很多细胞进程来说是很重要的,包括癌变前细胞的清除,细胞/组织的发育和内环境稳定。

如上所述,p53的一个最重要的肿瘤抑制功能就是它能够诱导凋亡。p53能够向上调节某些原凋亡基因如Bax的表达,为p53如何诱导凋亡的提供了证据。然而,比较Bax在p53(-/-)和p53(+/-)转基因鼠和野生型鼠中的表达,可以明显地看到当DNA受损时,仅在有限数量的组织表达受p53调节的Bax。因此,我们仍然不清楚为什么p53的表达只能够在特定的细胞类型诱导Bax的表达。最近的研究表明,p53发生的突变能够改变启动子特异性。两个致瘤的突变体p53基因显示出Bax启动子的反式激活作用缺陷,但能够反式激活其它p53靶基因,例如mdm2和p21waf1启动子。这些发现表明,能够反式激活如Bax基因在p53的肿瘤抑制功能中是非常重要的。

已知p53能够通过独立的或非独立的转录路径诱导凋亡。此外,p53诱导的凋亡,可以被致癌基因bcl-2阻断。然而bcl-2并不能抑制p53的反式激活功能。到目前为止,对于bcl-2是如何抑制p53诱导的凋亡的分子机制的了解是非常少的。

53BP2是一个p53结合蛋白,它最初是由Iwabuchi等于1994年发现的。53BP2通过酵母的双杂交系统分离得到,它包含了从蛋白质C末端开始的528个氨基酸。该蛋白包含一段富脯氨酸序列,4个锚蛋白重复,以及一个SH3结构域。随后它被鉴定为与Bcl-2相互作用的蛋白质(Naumovski和Cleary,1996)。该蛋白的一个更长的片段被分离并被命名为bBP2/53BP2,基于体外翻译数据,作者(Naumovski和Cleary,1996)预测bBP2/53BP2蛋白包含1005个氨基酸。

为了了解p53的凋亡功能是如何能够在体内被调节的,我们用53BP2的抗体处理细胞,发现在绝大多数受测细胞中,53BP2的表达水平很低。我们还发现内源的bBP2/53BP2出人意料地编码一蛋白,其长度大于

Naumovski 和 Cleary 预测的 1005 个氨基酸。该蛋白，即 ASP-2，包含了 1135 个氨基酸。

为了更清楚地描述本发明，将使用以下术语：

i) 长为 528 个氨基酸多肽将被称做 53BP2 或者 ASP-2/53BP2
5 (607-1135)

ii) 长为 1005 个氨基酸多肽将被称做 bBP2/53BP 或者 ASP-2/53Bbp2
(130-1135)

iii) 长为 1135 个氨基酸多肽将被称做 ASP-2/53BP 或者简称之为
ASP-2 (1-1135)。

10 括号中的数字代表相应于 ASP-2 的氨基酸数。

我们已经发现 bBP2/53BP 靠近 C 末端的一半，对 p53 的活性没有明显的作用。然而，ASP-2/53BP 激活 p53 的反式激活功能。让我们更感兴趣的是，ASP-2/53BP 能够特异性地加强 p53 对来自原凋亡相关基因，如 Bax 和 PIG-3，的启动子的反式激活功能。

15 使用 ASP-2 的 cDNA 序列，进行 BLAST 检索并鉴定得到一克隆名为 KIAA0771，它与编码 bBP2/53BP 的核酸序列高度同源，这表明该新鉴定的序列是编码凋亡刺激蛋白 (ASP's) 家族中的一个成员。该成员被称做 ASP-1。应用现有技术中已知的步移 PCR 技术，我们克隆得到了 ASP-1 cDNA，即 KIAA0771 的 5'上游的 100bp。对该 100 bp 序列，用
20 BLAST 程序进行检索，我们又鉴定得到了另一个 EST 克隆 (EMBO 登录号 AI625004)，该克隆与该 100bp 序列重叠并且还包含了 ASP-1 5'端的 700bp。获得 EST 克隆 AI625004 和 KIAA0771，并合并亚克隆得到全长的 ASP-1 的 cDNA 序列，如图 1B 所示。

我们将该新核酸序列命名为 ASP-1 (凋亡刺激蛋白 1)，它编码具有
25 与 53BP2/Bbp2 同源序列的多肽。ASP-1 和 ASP-2 序列在蛋白质水平的序列同源度如图 8A 所示。ASP-1 和 ASP-2 蛋白序列在 N 末端和 C 末端部分同源性最高。

这两个基因的染色体定位也已经被鉴定。ASP-1 是由位于 14 号染色体上的一个基因所编码。该基因的 17 个外显子和内含子的边界如图 1C
30 所示。绝大多数的外显子和内含子在 EMBO 登录号为 AL049840 的基因

组克隆之内。启动子区域和 5'末端的外显子和内含子被定位于 EMBO 登录号为 CNS01DTD 的基因组克隆之内。

此外，我们还鉴定到 ASP-2 的一个调节子，它抑制 ASP-2 对 p53 的激活作用。我们称该调节基因为 I-ASP。在表达 ASP-1 和 ASP-2 肿瘤中，
5 I-ASP 的表达相对于正常调节的情况下被上调。这表明 p53 的肿瘤抑制功能在体内可以被 ASP 和 I-ASP 正调节和负调节。

本发明的第一方面是提供一种多肽，或其一部分，它包含：

- i) 至少一个锚蛋白重复序列；
- ii) 一个 α 螺旋区域；
- 10 iii) 一个 SH3 结构域；

其特征在于该多肽至少能够激活 p53 的凋亡功能。

在本发明的一个优选实施方案中，所述多肽的特征在于由图 1c 或图 1d 所示多肽序列的至少一个区域能够与抗体，优选与单克隆抗体结合。

在本发明的另一个优选实施方案中，所述多肽包含一个 p53 结合位
15 点，并进而与 p53 建立起联系。优选地，所述联系是能够诱导和/或加强凋亡。

在本发明的一个优选实施方案中，所述多肽是来源于哺乳动物，理想地是来源于人。

在本发明的一个优选实施方案中，所述多肽由图 1c 或图 1d 所示氨基酸序列描述，它通过至少一个氨基酸的缺失、加成、替代进行进一步
20 修饰。

本发明的第二方面是提供一种分离的核酸分子，它包含选自以下组的 DNA 序列：

- i) 图 1a 或图 1b 所示 DNA 序列；
- 25 ii) 能与图 1a 或图 1b 所示 DNA 序列杂交，且编码本发明中的肿瘤抑制多肽的 DNA 序列；以及
- iii) i) 和 ii) 中所述 DNA 序列的简并 DNA 序列。

在本发明的一个优选实施方案中，提供了一种分离的核酸分子，它能够在严格杂交条件下与图 1a 或图 1b 所示 DNA 序列退火。

30 在本发明的另一个优选实施方案中，所述核酸分子是 cDNA。

在本发明的另一个优选实施方案中，所述核酸分子是基因组 DNA。

在本发明的再一个优选实施方案中，提供了由本发明的核酸分子所编码分离的多肽。

5 本发明的第三方面是提供一种核酸分子，其特征在于所述核酸分子是适合促进所述核酸分子编码的多肽的重组表达的载体的一部分。

在本发明的一个优选实施方案中，所述载体是表达载体，它适于真核基因的表达。

本发明的第四方面是提供一种制备本发明多肽的方法，它包括以下步骤：

- 10 i) 提供用本发明的核酸分子转化或转染的细胞；
 ii) 在适于表达所述多肽的条件下，培养所述细胞；以及
 iii) 从所述细胞中或其生长环境中纯化或分离所述多肽。

在本发明的一个优选实施方案中，所述核酸分子为本发明的载体。

15 在本发明的一个优选方法中，所述载体编码一分泌信号，也即所述重组多肽被赋予一分泌信号，它有利于纯化所述多肽。

在本发明的另一个优选的实施方案中，所述载体编码一段附加的氨基酸序列，也即所述重组多肽被提供一段附加的氨基酸序列，它有利于从细胞中或从细胞培养介质中纯化该重组多肽。例如组氨酸标签序列，它允许重组多肽结合于镍柱，或利用生物素酰重组多肽，它可以被抗生物素蛋白柱纯化。这些都是现有技术中的方法。

20 本发明的第五方面是提供一种抗体或其结合部位，它至少能与本发明中多肽的一部分相结合。

在本发明的一个优选实施方案中，所述的结合部位选自以下组：F(ab')₂、Fab、Fv 和 Fd 片段；包含了 CDR3 结构域的抗体。

25 在本发明的一个优选实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。

在本发明的另一个优选实施方案中，所述抗体是人源化的。

可选地，所述抗体是通过重组的方法产生的嵌合抗体。它包含所述抗体的可变区和人类抗体的恒定区。

30 嵌合抗体是重组抗体，其中所有来源于大鼠或小鼠抗体的 V 区与来自人类抗体的 C 区相结合。人源化抗体是重组杂交抗体，它融合了来于

啮齿动物抗体的 V 区的互补性决定区和来自人类抗体 V 区的构架区。本发明中，人类抗体的 C 区也被应用。上述互补性决定区 (CDRs) 位于抗体的重链和轻链的 N 末端结构域内，该结构域 V 区的多数变化是受到限制的。这些区域在抗体分子的表面形成环状结构。这些环状结构提供了抗体和抗原间的结合表面。

产生抗体方法是现有技术中众所周知的。本领域技术人员可以从一些实验室操作课本中得到。例如：Antibodies, Lane&Harlow, Cold Spring Harbour Laboratories。

本发明的第六方面是提供转化或转染的宿主细胞，尤其是用本发明的载体转染或转化的宿主细胞，使得其至少包括本发明的核酸分子的一部分，以允许由所述核酸序列编码的多肽至少部分或大部分例如功能片段的表达。

理想地，该宿主细胞是真核细胞，例如昆虫细胞，比如来自秋粘虫运用杆状病毒表达系统。这一表达系统对于该多肽的翻译后修饰是必须的。如果这样的修饰不是必须的则可以应用原核系统。

本发明的第七方面是提供测定本发明的 mRNA 和/或多肽的表达的方法。

本发明的第八方面是提供一种药物或兽药组合物，其特征在于上述组合物包含了本发明中的载体。

本发明的第九方面是提供一种药物或兽药组合物，其特征在于上述组合物包含了本发明中的多肽。

在本发明的一个优选的实例方案中，所述载体和/或多肽也可任意地包括稀释剂、载体或赋形剂。

本发明的第十方面是提供一种治疗方法，它包括：

- i) 对动物施以本发明的有效剂量的组合物；且
- ii) 检测所述治疗组合物对所述动物的效果。

在本发明的一个优选的方法中，所述治疗是癌症治疗。

在本发明的一个优选的实施方案中，所述的动物是人。

在本发明的另一个优选的实施方案中，所述的效果是指诱导凋亡。

本发明的另一个方面是提供一种筛选能够调节本发明的多肽活性的

试剂的方法，它包括：

- i) 提供一种表达本发明的多肽的细胞或细胞系；
- ii) 用至少一种受检试剂作用于所述细胞；并且
- iii) 检测所述试剂对于所述多肽的活性的影响。

5 本发明的另一个方面是提供一种筛选能够调节本发明中的多肽活性的试剂的方法，它包括：

- i) 提供至少一种根据本发明的多肽；
- ii) 用至少一种受检试剂作用于所述多肽；并且
- iii) 检测所述试剂被所述多肽的结合。

10 本发明的另一个方面是提供一种根据本发明的筛选方法所确认的试剂。

在本发明的一个优选的实施方案中，所述试剂是激动剂，它可以促进本发明中多肽的活性。

15 在本发明的另一个优选的实施方案中，所述试剂是拮抗剂，它抑制本发明中多肽的活性。优选地，所述试剂是一种多肽。

本发明的另一方面是提供一种反义的核酸分子，其中所述的分子包含了本发明的有义序列的反义序列。优选地，所述反义核酸分子包含了图 1b 所代表反义序列或其一部分。优选地，所述反义核酸分子包含了 ASP-2 序列的核苷酸的-253 到 839 位的有义序列的反义序列。

20 本发明的另一方面是提供了一种分离的核酸分子，它选自以下组：

- i) 图 10 所示的 DNA 序列；
- ii) 能与图 10 所示的 DNA 序列杂交的 DNA 序列，它编码本发明的肿瘤抑制多肽的抑制剂；和
- iii) i) 和 ii) 中所定义的 DNA 序列的简并的 DNA 序列。

25 在本发明的一个优选的实施方案中，提供了一种分离的核酸分子，它能够在严格杂交条件下与图 10 所示的序列退火。

本发明的另一方面是提供一种多肽或该多肽的一部分，它包含：

- i) 至少一个锚蛋白重复；
- ii) 一个 SH3 结构域；且

30 其特征在于所述多肽能够抑制图 1d 所示多肽的激活 p53 的活性。

在本发明的一优选实施方案中，所述的多肽也可包含富脯氨酸区域。

本发明的另一方面是提供一种多肽，它由图 11 所示的氨基酸序列所代表，该多肽可通过至少一个氨基酸的缺失、加成、替代进行修饰。优选地，所述多肽是来源人类。

5 本发明中用于 ASP-1 和 ASP-2 的各方面和实施方案也同样适用于 I-ASP。例如，产生包含有 I-ASP 的 DNA 序列的表达载体；用编码 I-ASP 的核酸分子转化或转染的细胞系；能与编码 I-ASP 的核酸序列所编码的多肽相结合的单克隆抗体或其类似物；包含编码 I-ASP 的核酸分子的药物组合物；包含编码 I-ASP 多肽的或其类似物药物组合物；应用编码
10 I-ASP 或 I-ASP 多肽的核酸分子的治疗方法；检测编码 I-ASP 的核酸或其类似物的方法；检测 I-ASP 多肽或其类似物的方法。

本发明的另一方面，还提供了一种反义核酸分子，其中所述分子包含了根据本发明的有义序列的反义序列。优选地，所述反义核酸分子包含了图 10 所示有义序列或其一部分的反义序列。最佳地，该反义核酸分子是 I-ASP 的核苷酸序列的-37 到 536 位的有义序列的反义序列。
15

本发明的另一方面，还提供了一种药物组合物，它包含了本发明的反义分子。

在本发明的一个优选的实施方案中，所述的反义核酸与至少一种化疗剂相结合。优选地，所述试剂是一种选自以下组的抗癌制剂：顺氯氨铂、铂黑、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、卡氮芥、氨甲叶酸、5-氟二氧嘧啶、
20 阿糖胞苷 (cytarabine)、巯基嘌呤、柔毛霉素、阿霉素、外茜草素 (epirubicin)、长春碱、长春新碱、更生霉素、丝裂霉素 C、红豆杉醇、L-天冬酰胺酶、粒细胞集落刺激因子、一种单烯双炔 (enediyne)，例如杯形生长抑制素 (chaliceamicin) 或望菌生长抑制素 (esperamicin)、
25 苯丁酸氮芥、ARC-C、长春地辛 (vindesine)、博来霉素、和表鬼白毒吡喃葡萄糖苷。其它可与前述试剂结合的试剂包括作用于肿瘤新血管系统或免疫调制剂的试剂。更佳地，作用于肿瘤新血管系统的试剂选自以下组，包含：combrestatin A4、血管紧张素 (angiostatin) 和 endostatin。优选地，所述免疫调制剂选自： α 干扰素、 γ 干扰素和肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

30 在本发明的一个优选的实施方案中，所述试剂为顺氯氨铂。

本发明的另一个方面还提供了一种制备与图 1d 所示序列的 1-130 位氨基酸相结合的单克隆抗体的方法，它包括以下步骤：

- (a) 用免疫原免疫具有免疫活性的哺乳动物，其中所述免疫原包括具有图 1d 的第 1-130 位氨基酸所示氨基酸序列的多肽；
- 5 (b) 融合被免疫的具有免疫活性的哺乳动物的淋巴细胞和骨髓瘤细胞形成杂交瘤细胞；
- (c) 筛选步骤 (b) 的杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体；
- (d) 培养所述杂交瘤细胞，产生单克隆活性以增殖和/或分泌所述的单克隆抗体；并
- 10 (e) 从其培养物的上清中收获所述单克隆抗体。

在本发明的一个优选方法中，所述具有免疫活性的哺乳动物是小鼠。

在一个可替代的优选方法中，所述具有免疫活性的哺乳动物是大鼠。

在本发明的再一个优选方法中，所述的哺乳动物是转基因动物，它转入了人免疫球蛋白基因或包含人免疫球蛋白基因的染色体核酸

- 15 因此，本发明一方面涉及到分离的 ASP-1，ASP-2 和/或 I-ASP 多肽，编码这些多肽的基因，它们的功能性修饰或变异体和有用片段，以及与其相关的治疗方法。这些基因表达通过结合到 p53 及其相关多肽上影响凋亡。

- 20 本文所用的与核酸相关的术语“分离的”是指：i) 体外扩增，例如通过聚合酶链式反应 (PCR)；ii) 通过克隆进行重组；iii) 纯化，即通过裂解和凝胶分离；或 iv) 合成，例如通过化学合成。一种分离的核酸可以通过已知的 DNA 重组技术很容易地进行操作。

- 25 因此，载体内所包含的核苷酸序列，若其 5' 末端和 3' 末端限制性位点是已知的或其用于聚合酶链式反应 (PCR) 的引物序列是已知的，我们就认为该核苷酸是分离的，但是存在于天然宿主中的天然状态的核酸序列则认为不是分离的。分离的核酸可以是基本上被纯化的，但不是必须的。例如，在克隆或表达载体中分离的核酸不是纯的，因为它可以包含仅一小部分在它的宿主细胞中的物质。但这样的核酸是分离的，该处使用该术语是因为它可以通过本领域技术人员熟知的标准技术，是很容易操作的。本文所用的分离的核酸不是存在于天然的染色体中。
- 30

本文所用与多肽相关的术语“它离的”是指从其天然环境中分离并以可被鉴定或使用的足够数量存在。当指蛋白质或多肽的时候，“分离的”的意思是，例如i) 通过表达性克隆选择性的产生，或ii) 通过层析法或电泳纯化。分离的蛋白质或多肽可以是基本上被纯化的，但不是必须的。

5 术语“基本上纯”是指该蛋白质或多肽基本上不含有其它可在天然状态或体内系统中发现的物质，使得它们适于其用途。基本纯的多肽可通过已知的现有技术生产。因为在药物制剂中，分离的蛋白质可以与药学上可以接受的载体相混合，该蛋白可以仅占该药物制剂很小的重量百分比。不管怎样该分离的蛋白质是指它已经从天然系统中存在的物质中分离出来，也就是说与其它蛋白质分离开。

本发明的一方面涉及编码 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 多肽，且在严格条件下与公开与此的核酸分子杂交，尤其是与包含了图 1a, 图 1b 或图 10 所描述分子的编码区的分子杂交的核酸序列。

因此，本发明的一个方面是那些编码 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 多肽且在严格条件下与本发明提供的核酸分子杂交的核酸序列。此处所用术语“严格条件”是指本领域内都很熟悉的相关参数。核酸杂交参数可以在参考书中找到，例如：分子克隆实验手册(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., 第二版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), 或 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。更特别地，此处所用的严格条件是指例如于 65°C 下进行杂交的杂交缓冲液 (3.5×SSC, 0.02% 菲可, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.02% 牛血清白蛋白, 2.5mM NaH₂PO₄(pH7), 0.5% SDS, 2mM EDTA)。SSC 是指 0.15M 氯化钠/0.015M 柠檬酸钠, pH 值为 7。SDS 是指十二烷基硫酸钠; EDTA 是指乙二胺四乙酸。杂交后, 于室温, 用 SSC 洗 DNA 转移膜两次。然后在至高到 68°C 下, 以 0.1-0.5×SSC/0.1×SDS 洗膜。

还有其它的条件, 试剂等等可用, 它们有相似的严格程度。本领域的技术人员很熟悉这样的条件, 因此在此不详述。但可理解的是, 本领域技术人员能够以某种方式操纵这些条件来清楚地鉴定本发明的 ASP-1, ASP-2 或 I-ASP 核酸序列。本领域熟练的技术人员熟知筛选表达上述分

子的细胞和基因文库的方法，然后常规地进行分离，紧跟着分离相关的核酸分子并进行测序。

一般而言，本发明的核苷酸和氨基酸序列与其同系物和等位基因，各自有至少 90%的一致性和/或至少 95%的一致性。在某些情况下，将会有至少 95%的核苷酸一致性和/或 97%的氨基酸一致性，在另一些情况下将达到至少 98%的核苷酸一致性和/或 99%的氨基酸一致性。同源性可以通过各种可以公开获得的由 NCBI (Bethesda, Maryland) 开发的软件来计算，它们可以通过因特网获得 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>)。

可列举的工具包括可通过因特网地址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 获得的 BLAST 系统，较佳地是使用缺省值。配对和串序列对比 (BLOSUM30 矩阵设置) 以及 Kyle-Doolittle 亲水性分析可以通过 MacVector 序列分析软件获得 (Oxford Molecular Group)。前述核酸的 Watson-Crick 配对互补序列也包含在本发明中。

检测与在此描述的核酸序列同源的编码 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 蛋白的核酸，可采用前述条件下的 DNA 印迹法，并一起使用可用于检测的探针 (例如放射性的，化学发光的)。DNA 最终转移并洗膜后，探针信号可以被检测到，如将膜置于 X 光片上或磷光盘上来检测放射信号，或通过处理膜来检测化学发光信号。

本发明还包括了含有天然物质的可替代遗传编码的简并核酸序列。例如，丝氨酸残基可由以下六个遗传密码所编码：TCA、AGT、TCC、TCG、TCT 和 AGC。每一遗传密码都同样地编码丝氨酸残基。因此，对于本领域普通技术人员来说，很显然地任何一个编码丝氨酸核苷酸的三联密码 (triplet) 都可导入体内或体外的蛋白合成装置，以将丝氨酸残基结合到延伸的多肽中。同样地，编码其它氨基酸残基的三联核苷酸序列的密码子包括，但不限于：CCA、CCC、CCG、CCT (脯氨酸密码子)；CGA、CGC、CGG、CGT、AGA 和 AGG (精氨酸密码子)；ACA、ACC、ACG 和 ACT (苏氨酸密码子)；AAC 和 AAT (天冬酰胺酸密码子)；以及 ATA、ATC 和 ATT (异亮氨酸密码子)。其它的氨基酸残基也类似地被多核苷酸序列编码。因此，由于遗传密码的简并性，本发明还包含了不同于生物学上分离的核酸密码子序列的简并核酸序列，

本发明还提供了经修饰的核酸分子或多肽，它包括一个或多个核苷酸或氨基酸的增加、取代和缺失。此处的“一个或多个”是指 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 或更多个，但实质上不会改变所述分子的功能，因为我们希望这些分子的功能与原始（被修饰）的核苷酸或多肽的功能基本上相同。功能的实质性变化可以是，例如，显性失活蛋白，或失去一个或多个功能的蛋白质。

在优选的实施方案中，这些经修饰的核酸分子和/或多肽，它们编码至少保留未经修饰的核酸分子和/或多肽的一种活性和功能，例如 p53 的结合功能，抗原性，转录活性等。在某些实施方案中，经修饰的核酸分子编码经修饰的多肽，特别是那些本申请它处描述的具有保留氨基酸取代的多肽。这些经修饰的核酸分子在结构上与未经修饰的核酸分子相关，它们在优选实施方案中与未经修饰的核酸分子在结构上足够相关，从而经修饰的和未经修饰的核酸分子能够在高度严格条件下杂交，这在现有技术中是已知的。

例如，可以制备编码有单个变化多肽的经修饰的核酸分子。每个核酸分子可以有一个、两个或三个核苷的替代，不包括描述于此的根据遗传密码的简并性发生的核苷变化。同样地，也可以制备编码有两个氨基酸变化多肽的经修饰的核酸分子，例如 2-6 个核苷的替代。本领域技术人员可以很容易地预想到许多这样的经修饰的核酸分子，包括例如编码氨基酸 2 和 3, 2 和 4, 2 和 5, 2 和 6 等的密码子内的核苷替代。在前述例子中，每两个氨基酸的结合都包括经修饰的核酸分子的结合，还包括编码氨基酸替代的全部核苷替代。编码具有其它替代（即 3 个或更多），增加或缺失（例如通过引入终止密码子或剪接位点）的多肽的其它核酸分子，也是本领域普通技术人员根据本发明很容易就可以想到的。前述任何核酸或多肽能够通过常规试验检测到，保留与在此公开的核酸和/或多肽结构和活性上的相关性。

本发明还提供了 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 的分离片段或其互补片段，其长度足以代表该序列在人的基因组中是独特（unique）的，并识别编码 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 多肽的核酸。这些片段之所以被认为是独特的，

因为它是较长核酸的特征 (signature)。独特片段是指, 例如, 该片段足够长, 能够精确地确保在上面所定义的 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 之外的分子中找不到该序列, 也即它特异性地鉴定 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 序列。独特片段包括了邻近的核苷序列, 它与本申请申请日之前的公共数据库中的任何序列都不一致 (例如, GenBank), 尽管某些片段可能是 GenBank 中已知片段的一部分。另外, 公开的已知的序列的互补序列或其片段可能是 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 的独特片段的一部分, 但不是全部。因此该独特片段在定义上不包括只含有 EST 和/或在本申请的最早申请日之前在公共数据库中可获得的基因序列。因此, 该独特片段必须包含除 GenBank 中的序列或其片段之外的核苷序列。这种差异可以是 GenBank 中的序列的添加、缺失或替代或完全不同于 GenBank 中的序列的序列。

包含独特片段的 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 核酸分子的片段, 可在印迹杂交方法中用做探针 (如 Southern, Northern) 来鉴定所述核酸, 在核酸酶保护方法中测量转录水平, 或可用于如应用 PCR 的那些扩增方法中。本领域的技术人员都知道, 在如 Southern 印迹和 Northern 印迹的某些情况下更倾向选用大探针, 例如 200, 250, 300 或更多的核苷, 而在诸如 PCR 的情况下则更倾向较小的片段。为了生成抗体或决定该多肽片段的结合情况, 或为了产生免疫测定的成分, 这些片段还可用于生产融合蛋白。同样地, 这些片段可用于产生 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 多肽的非融合片段, 如 N 末端和 C 末端片段, 或公开于此的蛋白结构域, 可用于在免疫测定中制备抗体, 以及如在治疗中作为与 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 多肽, 和/或其它与 p53 或 rel 多肽结合的多肽进行竞争性结合的对象。这些片段可以更进一步用作描述于此的反义分子, 它可抑制 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 核酸和多肽的表达, 尤其是用于治疗目的, 在此有更多的详细描述。

就象本领域的技术人员将认识到的那样, 所述独特片段的大小取决于其遗传密码的完整性。因此, ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 核酸分子及其互补的核酸分子的某些区域将要求更长的部分来保证其独特性, 而其它的区域只要求一个短部分, 典型地是在 12-32 个核苷之间 (例如, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 和 32 碱基长度)。该公开旨在包含每个序列的每一个片段, 从第一个核苷开始, 第二个核苷等等, 一直到不包含末端的 8 个核苷, 在从每个序列的第 8, 9, 10 个核苷等等的任何地方终止, 直到最后一个核苷 (条件是序列是如上所述的独特的)。许多 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 核酸的部分, 或其互补的序列, 有 25 个或更多的核苷, 它们在长度上是独特的。本领域的技术人员熟知选择这样的序列的方法, 典型地是籍以独特片段能够选择性地将我们感兴趣的序列与非 ASP 和 I-ASP 核酸区分开来。尽管可以进行体外的确证杂交和确证性测序分析, 但将这些片段的序列与已知数据库中的序列进行比较通常就可以但也是必需的。

片段可以是功能片段。本发明核酸分子的功能片段是保留了大的核酸分子的一些功能特性, 例如编码功能性多肽, 与蛋白质结合 (如与 p53 结合), 调节可操作地连接的核酸转录, 编码免疫识别抗原决定部位等。本领域的普通技术人员可以很容易地决定采用本申请所述方法和本领域众所周知的方法, 采用常规实验便可决定一个片段是否是一个核酸分子的功能性片段。

如上所述, 本发明包含了反义寡核苷酸, 它们可以选择性地结合于编码 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 多肽的核酸分子, 并调节 p53 的结合, 例如转录活性或凋亡。几乎在所有的医学状况下, 例如癌症和涉及异常的凋亡的情形, 都期望能够调节 p53 活性。

在此所用术语“反义寡核苷酸”或“反义”是描述寡核苷酸, 更确切地说是寡核糖核苷酸、寡脱氧核糖核苷酸、经修饰的寡核糖核苷酸、或经修饰的寡脱氧核糖核苷酸, 它们在生理条件下于包含特定基因的 DNA 或转录该基因的 mRNA 杂交, 从而抑制所述基因和/或所述 mRNA 的翻译。通过与靶基因或转录本的杂交, 反义分子被设计用于干涉靶基因的转录或翻译。本领域技术人员能够识别该反义寡核苷酸的精确长度, 它与靶基因的互补程度取决于所选择的特定的靶基因, 包括靶基因的序列和包含该序列的特定碱基。优选地所述反义寡核苷酸被构建用于在生理条件下与靶基因选择性地结合, 也就是说, 在生理条件下它与靶序列杂交的程度实质上大于与靶细胞中的其它序列。基于在此所述的 ASP-1, ASP-2

和 I-ASP 核酸序列，或基于其等位的或同源的基因组序列和/或 cDNA 序列，本领域的技术人员可以容易地选择并合成根据本发明的任一适合的反义分子。例如，可以制备“染色体基因步移 (gene walk)”，其含一系列 15-30 个核苷的寡核苷酸，它们跨越 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 的核酸长度，接着检测其对相应的 ASP-1, ASP-2 或 I-ASP 表达的抑制。可选地，可在寡核苷酸间留下 5-10 个核苷的裂口来减少合成和检测的寡核苷酸数目。

为了达到完全地选择性有效抑制，所述反义寡核苷酸应该包含至少 10 个，更佳地至少 15 个连续的碱基，它们与靶序列互补。尽管在某些情况下，经修饰的寡核苷酸短至 7 个碱基长度也已被成功地用做反义寡核苷酸 (Wagner et al., Nature Biotechnol. 14: 840-844, 1996)。最优地，所述反义寡核苷酸包含 20-30 个碱基的互补序列。尽管反义寡核苷酸可以是选做基因或 mRNA 转录本的任一区域的反义序列，但在优选的实施方案中的反义寡核苷酸对应于 N 末端或 5' 上游的位点，例如翻译起始位点、转录起始位点或启动子位点。此外，3'-非翻译区可作为靶序列。现有技术中采用了靶向 mRNA 的剪接位点，但是当可替代的 mRNA 剪接发生的时候它不是优选的。此外，反义序列更佳地是靶向到不期望 mRNA 的二级结构的位点(参见，例如，Sainio 等, Cell Mol. Neurobiol. 14(5): 439-457, 1994), 在这些位点也不期望结合蛋白质。最后，尽管在此只描述了 ASP-1, ASP-2 和 I-ASP 的 cDNA 序列，但是本领域的普通技术人员可以容易地获得相应于这些 cDNA 的基因组 DNA。因此，本发明还提供了可与 ASP-1, ASP-2 或 I-ASP 的基因组 DNA 互补的反义寡核苷酸。相似地，得到与 cDNA 和基因组 DNA 等位的或同源的反义序列也不需要付出过多的试验。

25 在一组实施方案中，本发明的反义寡核苷酸可以包含“天然的”脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、或它们的任意结合。也就是说，一个天然核苷的 5' 末端可以通过磷酸二酯键和另一个天然核苷的 3' 末端共价结合起来，就象在天然系统中一样。这些寡核苷酸可通过已知方法制备，如人工或自动合成器。它们也可由载体重组产生。

30 然而，在本发明的一些优选实施方案中，反义寡核苷酸还可以包含

经修饰的寡核苷酸。也就是说，寡核苷酸可以被多种方式所修饰，所述方式不阻止它们与靶序列杂交，但是加强了它们的稳定性或导向性或加强了它们的治疗效果。

所用术语“经修饰的寡核苷酸”是指这样的寡核苷酸，其中（1）至少两个核苷通过合成核苷酸间键合共价连接（也就是，不同于一个核苷的5'末端通过磷酸二酯键和另一个核苷的3'末端共价结合）和/或（2）与核酸非正常地结合的化学基团共价连接到所述寡核苷酸上。优选的合成核苷酸间键合是硫代磷酸酯、烷基磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三脂、乙酰胺酯、羧甲基酯和多肽。

术语“经修饰的寡核苷酸”还包含了与经修饰的碱基和/或糖共价结合的寡核苷酸。例如，经修饰的寡核苷酸包括寡核苷酸具有糖骨架，它与低分子量的除3'位的羟基和5'磷酸基团外的有机基团共价连接。因此，经修饰的寡核苷酸可以包括2'-氧-烷基核糖基团。此外，经修饰的寡核苷酸可以包含如树胶醛糖代替核糖。因此，本发明预期药物制剂包含了能在生理条件下与编码ASP-1，ASP-2和/或I-ASP多肽的核酸互补和杂交的经修饰的反义分子，以及药学上可接受的载体。

反义寡核苷酸可作为药物组合物的一部分给药。这样的药物组合物可以包括与任何现有技术中已知的、标准的生理上和/或药学上可接受的载体组合的反义寡核苷酸。该药物组合物应当是无菌的并包含治疗有效剂量的反义寡核苷酸，它以适于施用于病人的重量或体积为单位。所述载体的特性取决于给药途径。生理上和药学上可接受的载体包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂以及其它现有技术中已知的物料。

所用术语“载体（vector）”可以通过限制性酶切和连接被导入其中一段所期望序列的任意的核酸，用于在不同的遗传环境中运输或在宿主细胞中表达。尽管RNA载体也是可获得的，但载体通常是指包含DNA的载体。载体包括，但不限于，质粒、嗜菌体和病毒基因组。一个克隆载体是能够在宿主细胞中复制的，更典型地它还含有一个或多个可决定性地切割载体的核酸内切酶位点，并连接了感兴趣的DNA序列，这样新

5 重组载体保留了其在宿主细胞中复制的能力。在质粒的情况下，当质粒的拷贝数增加时，目的序列的复制可在宿主菌发生很多次；或在宿主细胞通过有丝分裂进行增殖前，目的序列仅在每个细胞复制一次。在噬菌体的情况下，复制可能在裂解阶段很活跃或在溶原阶段是被动的。表达载体是通过限制性酶切和连接导入其中所期望的 DNA 序列，使其可操作地连于调节序列且可作为 RNA 的转录本表达。载体还可以包括一个或多个标记子序列，适于鉴定是否被载体转化或转染的细胞。标记子包括，例如，编码蛋白质的基因，该蛋白质能增强或减弱其对抗生素或其它化合物抗性 or 敏感性；及编码酶的基因，该酶的活性可以通过现有技术中的标准技术检测（例如， β 半乳糖苷酶、荧光素酶或碱性磷酸酶）；和基因，它能明显地影响转化或转染细胞、宿主、克隆或色斑（如各种荧光蛋白质，例如绿色荧光蛋白，GFP）的表型。优选的载体是那些能够自主复制并表达存在于 DNA 片段中并可其可操作地连接的结构基因产物。

15 这里所述的编码序列和调节序列被“可操作地”连接，是按照将编码序列表达或转录置于调节序列的影响和控制之下的方式将它们以共价方式相连接。如果期望编码序列被翻译成蛋白质，所述两个 DNA 序列被可操作地连接，诱导 5' 调节区启动子使编码序列被转录。如果两个 DNA 序列的连接不是可操作地，（1）导致移码突变的发生，（2）干扰启动子区启动编码序列的转录，或（3）影响相应的 RNA 转录本被翻译成蛋白质的能力。因此，启动子区应该被可操作地连于编码序列，如果启动子区域可以影响上述 DNA 序列的转录，其结果是将导致转录本能够被翻译成所期望的蛋白质或多肽。

25 用于基因表达所需要的调节序列的准确性质会因物种或细胞类型的不同而不同，但大致上都将包括，必需的 5' 非转录和 5' 非翻译序列，它们分别与转录和翻译的启动相关，比如 TATA 框，加帽序列，CAAT 序列等。特别地，上述 5' 非转录调节序列包括了一个启动子区域，它包含与其可操作地相连的基因的转录控制的启动子序列。调节序列也可以如所望包括一个加强子序列，或上游活化子序列。本发明的载体可选地包括 5' 先导序列或信号序列。本领域的普通技术人员都能够选择并设计合

适的载体。

表达载体包含了表达所必需的所有元件，可以通过商业途径获得并为本领域技术人员熟知。参见，例如，Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbour Laboratories Press, 1989。细胞通过遗传工程手段导入了编码 ASP-1, ASP-2 和/或 I-ASP 多肽或片段或其变异体的异源 DNA 或 RNA 的细胞中。所述异源 DNA 或 RNA 被可置于转录元件的可操作控制下，使得异源 DNA 在宿主细胞中表达。

哺乳动物细胞理想的 mRNA 表达系统有如 pcDNA3.1 和 pRc/CMV (从 Invitrogen 获得, Carlsbad, CA), 它们包含了一个选择标记子, 例如赋予其 G418 抗性 (促进选择稳定的转染细胞系) 的基因, 和人巨细胞病毒 (CMV) 增强子-启动子序列。此外, 适于在灵长类或犬的细胞中表达的是 pCEP4 载体 (Invitrogen), 它包含了一个 EB 病毒 (EBV) 复制起始点, 作为多拷贝的染色体外遗传因子促进质粒的维持。另一个表达载体是包含了多肽延长因子 1 α 的 pEF-BOS 质粒, 它能够提高体外转录的效率。质粒已由 Mishizuma 和 Nagata 所描述 (Nuc. Acids Res.18: 5322. 1990), 将其用于转染试验也已被公开, 例如, Demoulin (Mol.Cell.Biol.16: 4710-4716)。还有一个理想的表达载体是腺病毒, 这已被 Stratford-Perricaudet 所描述, 它缺损 E1 和 E3 蛋白 (J.Clin.Invest 90: 626-630, 1992)。腺病毒用作腺 P1A 重组体由 Warnier 等公开, 对小鼠皮内注射以产生 P1A 的免疫作用 (Int. J.Cancer, 67: 303-310, 1996)。

本发明还包含表达试剂盒, 这使得本领域技术人员可以构建所需的表达载体。这样的表达试剂盒至少包括了前面所讨论的编码序列的各分离的部分。可以根据需要添加其它组分, 只要前面所说的必需的序列被包含在其中。

本发明还容许在细胞和动物中剔除了 pcDNA3 基因的构建体, 为研究 p53 活性、凋亡、和癌症的某些方面提供素材。

本发明还提供了一种分离的多肽, 它包括已公开的 ASP-1、ASP-2 和 I-ASP 多肽及其片段。这些多肽是有用的, 例如, 单独地或作为融合蛋白检测和调节 p53 的结合, 调节凋亡、产生抗体、和作为免疫测定的

组分。

通常，ASP-1、ASP-2 和 I-ASP 多肽的片段具有与前面讨论的核酸相同的特征和特性。本领域技术人员都能认识到，独特片段的大小将取决于如该片段是否包含了保守蛋白区域的一部分这样的因素。因此，ASP-1、
5 ASP-2 和/或 I-ASP 多肽的一些区域将要求更长的部分来满足独特性，而其它区域则只需要较短的部分，典型的是在 5-12 个（即，5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 个氨基酸长）氨基酸之间。

ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 多肽的片段更佳地是保留了该多肽明显的功能特征。保留于多肽的独特片段的功能特征包括与 p53 或 rel 的结合，
10 与抗体作用，和酶的活性。例如，如本文所例举，ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 多肽的某些片段能够用做与本发明的方法得到的 ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 的全长多肽的功能等价物，包括，例如结合 p53，调节凋亡等等。其它 ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 多肽片段可以根据其功能特征筛选。例如，本领域的常规技术可以构建 ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 片段的重组体并采用后面实施例部分描述的方法检测这些片段，例如与 p53 多肽
15 结合。本领域的技术人员也都精通选择独特氨基酸片段的方法，尤其是基于独特片段的功能以选择性地感兴趣序列从非家族成员中筛选出来。通常仅需将该片段序列于在已知的公共数据库中的那写进行比较，这是必需的。

20 本发明包含上述 ASP-1、ASP-2 和 I-ASP 多肽的变异体。本文所用的 ASP-1、ASP-2 和 I-ASP 多肽的“变异体”是指包含了多肽的原始氨基酸序列一个或多个修饰。对 ASP-1、ASP-2 和/或 I-ASP 多肽施以能够产生变异体的修饰 1) 来降低或者消除 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的活性，例如与另一多肽结合；2) 来加强 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的功能，例如在表达系统中的蛋白稳定性或蛋白之间结合的稳定性；或 3) 提供相对于 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的新的活性或功能，例如增加抗原决定部位或可检测的部分。ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的修饰尤其是发生在编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的核酸上的修饰，可以包括缺失、点突变、
25 平截、氨基酸替代和增加一个或多个氨基酸或非氨基酸部分。与变异体
30 相关的“一个或多个”是指 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 个或更多的改变。可选地，修饰可以直接在多肽上进行，比如通过裂解，增加连接子分子，增加如生物素的检测部分，增加脂肪酸等等。修饰也包含了融合蛋白，该融合蛋白包含了 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 氨基酸序列的全部或部分。

一般说来，变异体包括被特异性修饰的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽来改变多肽与其生理活性无关的性质。例如半胱氨酸残基可以被替换或缺失以阻止得到不希望的二硫键。相似地，某些氨基酸的改变通过消除在表达系统中被蛋白酶的蛋白质水解以加强 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的表达（例如，在含 KEX2 蛋白酶活性酵母系统中的二碱基氨基酸）。

编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的核酸发生的突变更适宜保持氨基酸编码序列的阅读框，也更适于不在核酸内产生由于杂交形成的二级结构的区域，比如对变异体多肽表达有害的发卡结构或环状结构。

通过选择氨基酸替代可以获得突变，或通过编码多肽的核酸内选择位点的随机变异的发生。变异体多肽随后被表达并检测其一种或多种活性来决定什么样的突变提供了具有所期望特性的变异体多肽。还可以对变异体（或非变异体 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽进一步突变，它们是这些多肽的氨基酸序列的沉默突变，但提供了更佳的在特定的宿主细胞翻译的密码子。例如适于在 *E.coli* 中翻译的密码子，是本领域普通技术人员众所周知的。此外其它的突变也可以发生在 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 基因或 cDNA 克隆的非编码序列来提高多肽的表达。变异体 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的活性可以通过以下方法检测，将编码它们的核酸分子克隆到细菌或哺乳动物表达载体，将该载体导入合适的宿主细胞，表达变异体 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽，并检测本文所公开的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的功能活性。例如，变异体 ASP 多肽可以通过 p53 的结合进行检测，这在实施例中有描述。其它变异体多肽的制备可能适于检测另外的活性，这是本领域普通技术人员众所周知的。

本领域技术人员还将认识到，发生在 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的保守性氨基酸替代可以提供前述多肽的功能上相当的变异体，也就是说，该变异体保留了 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的功能。如本文所述，“保守

性氨基酸替代”是指这样的氨基酸替代，即不改变被氨基酸替代的蛋白质相对电荷和大小特征。变异体可按照本领域普通技术人员所熟知的改变多肽序列的方法来获得，在一些描述这样的方法的参考书中可以获得这样的方法，例如，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., 第二版，Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989，或 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。具有代表性的与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽功能等同的突变体包括了其氨基酸序列的一个或多个保守性氨基酸的替代。氨基酸的保守性替代包括在以下组中发生的氨基酸替代：

10 (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 和 (g) E, D。

发生在 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的氨基酸序列的保守性氨基酸替代能生成与其功能等同的变异体，典型地是通过改变编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的核酸。这样的替代可由本领域的普通技术人员通过多种方法获得。例如，通过 PCR 定向突变产生氨基酸替代，根据 Kunkel 所公开的方法的定点突变 (Kunkel, Proc. Nat. Acad. U.S.A. 82: 488-492, 1985)，或通过编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的基因的化学合成。如氨基酸替代在 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的小独特片段上，如 p53 结合位点缩氨酸，可以通过直接合成缩氨酸得到这样的缩氨酸替代。与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽功能等同的片段的功能活性可以通过如下方法检测，将编码被改变的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的基因克隆到细菌或哺乳动物表达载体上，将该载体导入合适的宿主细胞，表达经改变的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽，并检测本申请所述的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的功能活性。化学合成得到的缩氨酸可以直接通过功能进行鉴定，例如，

20 与 p53 结合的功能。

25

依照本文所述，本发明有很多用途，其中一些在本文的其它部分描述。首先，依据本发明能够得到完整的分离的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 蛋白质分子。本领域的技术人员熟知获得分离的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽分子的各种方法。该多肽可通过层析法或免疫识别从天然产生该多

30

肽的细胞中纯化。可选地，可将表达载体导入细胞来引起多肽的生成。在另一个方法中，mRNA 转录本可以通过微注射或别的方式导入细胞中来引起编码多肽的生成。mRNA 的转录产物在无细胞抽提物，如网织红细胞裂解物的翻译系统中进行翻译成多肽。用来分离 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的方法熟知的技术。它们包括免疫层析、HPLC、过筛以及亲和层析等多种方法。

对 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 核酸分子的分离也使得本领域技术人员可以通过表达这些分子从而诊断特征性的紊乱（或其相对缺失）。这些方法包括确定 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 核酸的表达，以及/或从其衍生的多肽。在前一种条件下，这种确定可以用标准的核酸检测方法进行，比如如下所述的聚合酶链式反应或通过标记杂交探针得到。

本发明通过 p53 以及 rel 与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 等蛋白的结合，对 p53 以及 rel 进行分离。对于 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的结合活性的确定，从而使得本领域技术人员对蛋白活性和下游功能的调节成为可能，比如凋亡。这里将描述更多的用途。

在某些实施方案中，本发明提供从 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 衍生的“显性抑制(dominant negative)”多肽。所谓的显性抑制肽是一种蛋白的非活性变异体。用一种与细胞器作用的非活性变异蛋白替换掉与细胞器作用的活性蛋白或让它同活性蛋白竞争，由此减弱活性蛋白的作用。比如，一个与配体结合的显性抑制受体不会对这种结合发生响应并传递信号，从而降低这种配体表达的生物学作用。同样的，一个与正常的靶蛋白作用但不使该蛋白磷酸化的显性抑制的非活性催化激酶将导致响应细胞信号的靶蛋白磷酸化作用的减弱。相似地又如，在基因的控制区域与另一个转录因子结合或与一个启动子点结合但不增加基因转录的显性抑制的转录因子，通过占据启动子的结合位点，虽不增加转录但使得正常转录因子的效果下降。

最后的结论是：在细胞中表达一种显性抑制肽将降低活性蛋白的功效。本领域技术人员可以评估一种蛋白的显性抑制变异体的潜能，并运用标准的突变成形技术生产一种或多种显性抑制变异体多肽。比如，通过公开于此的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的教导，普通的本领域技术人

员就可以对 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽进行特异点突变的引入，扫描突变，部分基因的删减或截除等等（U.S. Patent No. 5,580,723; Sambrook 等，分子克隆：实验手册，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory 出版，1989）本领与普通技术人员可以检测突变多肽的群体检测从而减少选择的活性（比如 p53 的结合，凋亡的调节）和/或者保持这种活性。其它的制备或检测蛋白的显性抑制变异体的类似的方法也为本领域技术人员所掌握。

本发明还包括一些试剂。比如一些多肽，它们与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽结合，与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽以及它们的结合配对物如 p53 等的复合物结合。这种结合试剂将被用于比如监测测定，检测 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽以及 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽与其结合配对物的复合物的存在与否，以及在纯化过程中分离 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽同其结合配对物的复合物。这样的试剂也可以被用于通过如与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的结合，或与其结合配对物的结合，或与两者的结合，来抑制 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽，或它们的结合配对物的活性。

此外，本发明肽结合试剂，比如它们可以是与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽具有选择性结合的抗体或抗体片段。抗体包括依据常规方法制备的多克隆抗体和单克隆抗体。

特别要强调的一点，正如该领域众所周知的，只有抗体分子的一小部分—抗体决定簇参与抗体与抗原决定簇的结合（Clark, W.R.1986 The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. 1991 Essential Immunology, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications,Oxford）。比如 pFc'和 Fc 区域是补体级联反应的受动器但并不与抗原结合。一个 pFc'区域被酶解掉的抗体或是生成的没有 pFc'区域的抗体，指定的一个 F(ab')₂ 片段，仍然保留了抗体完整的与抗原结合的位点。与之类似，一个抗体的 Fc 区域被酶解掉或者生成的没有 Fc 区域的抗体，指定的一个 Fab 片段，仍然保留了抗体分子与抗原的完整结合位点。Fab 片段是由抗体的一个共价结合的轻链和记为 Fd 的部分抗体重链。这个 Fd 片段是决定抗体特异性的主要部分（一个 Fd 片段可以与多

达十种不同的轻链相联系，而不改变抗体的特异性)，并且 Fd 片段分离中仍然保留与抗原决定簇的结合能力。

在抗体的抗原结合部位，本领域周知有互补决定区 (CDR) 和骨架区 (FRs)，互补决定区直接与抗原的抗原决定簇相作用，骨架区则保留了抗原决定簇的三级结构 (Clark, 1986; Roitt, 1991)。在重链 Fd 区及 IgS 的免疫球蛋白的轻链中都有四个骨架区 (RF1- RF4) 分别分布于三个互补决定区 (CDR1-CDR3)。这些互补决定区 (CDR)，特别是 CDR3 区而且主要是重链的 CDR3，主导决定抗体的特异性。

现有技术已经证实哺乳动物抗体的非 CDR 区域可以被保留了原抗体表位特征的同种或异种抗体的类似区域的所代替。这些在发展和使用“人性化”的抗体的过程中已被非常清楚地证实，其中那些非人类的 CDR 通过与人的 FR 或 Fc/pFc' 区域共价键连在一起产生功能性抗体。参见美国专利 4,816,567; 5,225,539; 5,585,089; 5,693,762; 和 5,859,205。

例如，PCT 国际公开 WO 92/04381 教导了人类 murineRSV 抗体的制备和使用，该抗体中，murine FR 区域的至少一部分被人源的 FR 区域所替代。此抗体中含有具有结合抗原能力的完整抗体片段，通常被称为嵌合 (chimeric) 抗体。

通过转人类的免疫球蛋白基因到非人类的动物体内使之免疫的方法，人的单克隆抗体可以被完全制备。见 USP 5,814,318; 5,877,397; 6,091,001; 6114598。

对本领域技术人员是非常明显的，本发明也适用于 F(ab')₂，Fab，Fv，Fd 的片段；嵌合抗体，其中，Fc、FR、CDR1、CDR2 或轻链 CDR3 区被一些人类或其它非人类的同源序列替换；嵌合 F(ab')₂ 片段抗体，其中 FR、CDR1、CDR2 或轻链 CDR3 区被一些人类的或非人类的同源序列所代替；嵌合 Fab 片段抗体，其中的 FR、CDR1、CDR2 或轻链 CDR3 区被人类的或其它非人类的同源序列替换；以及嵌合 Fd 片段抗体，其中的 FR、CDR1 和/或 CDR2 区域被人类的或非人类的同源序列所代替。本发明也包括所谓的单链抗体。

本发明包括了多种大小和类型的多肽，它们可以特异地与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽相结合，以及与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽和它们

的结合配对物的复合物相结合。这些多肽可以通过天然资源获得，而不是通过抗体技术。比如，这些多肽结合试剂可以由简并肽文库提供，这种文库可以容易地被制备成溶液或固定形式，也可以制备成噬菌体表面呈现抗体库。合成肽组合文库也可合成包括一个或多个氨基酸的肽。文库也可以是合成具有肽与非合成肽部分的水库。

噬菌体呈现 (display) 技术可以特定高效的确定发明的结合肽。简言之，制备的噬菌体抗体库 (使用 m13, fd 或 lambda 噬菌体)，使用常规的处理可以呈现插入的 4 到约 80 个氨基酸残基。比如这种插入是可以代表一个全简并或不对称的阵列。这样就可以选择载噬菌体的插入与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽结合。这一过程可以通过几轮的反复筛选与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的结合的噬菌体重复进行。重复的过程导致了载有特定序列的噬菌体的富积。通过 DNA 测序分析可以确定表达肽的序列。这样就可以确定出一个可以与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽结合的最小的线性序列部分。我们可以用一个不对称的水库来重复这一过程，该文库中含有全部或部分的最小线性部分的插入，在它的上游或下游再加上一个或多个简并残基。酵母的双杂交体系扫描方法也可以用于确定与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽相结合的多肽。这样，本发明的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或者其片段可以用于扫描肽文库，包括噬菌体呈现文库，从而确定和选择本发明 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的肽结合配对物。这些所述的分子是可以被用来进行筛选测定，进行纯化，用于直接抑制 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的功能以及用于本领域技术人员熟悉的其它目的。

本发明也包括 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的 cDNA 序列在表达载体中的应用，它们被转染到寄主细胞或细胞系，包括原核的 (如大肠杆菌) 或真核的 (如 CHO, COS, 酵母表达系统以及在昆虫中的重组杆状病毒)。除了在哺乳动物如人、鼠、大鼠、猪、山羊，灵长动物等的细胞中有用外，它们也在广泛的多组织型中起作用，包括原生细胞及细胞系。特别的例子包括角质细胞，外周血白细胞、纤维原细胞，骨髓干细胞和胚胎干细胞。表达载体是需要相关序列的，上述的核酸序列连入到一个启动子。

本发明还包括转基因非人类动物。在这里，“转基因非人类动物”包括具有一个或多个外源核酸分子整合到生殖系细胞和/或体细胞的非人类动物。这种转基因动物包括具有通过同源重组得到的纯合或杂合基因裂变的剔除(knockout)动物，以及具有游离的或染色体整合的表达载体的动物。剔除动物可以通过现在熟悉的胚胎干细胞同源重组制备。这种重组可以通过 cre/lox 系统或其它本领域技术人员熟知的的重组酶系统而实现。在某些实施方案中，重组酶系统本身是依赖条件表达的，比如在特定组织或细胞型中在胚胎或胚胎发育后期的特定阶段，由于外源的复合物诱导表达的增加或减少等。一般来说，在这种系统中使用的条件表达载体使用不同的启动子来控制所要的基因表达模式(比如时间或空间的)。条件型启动子也被连接到 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的核酸分子上，从而以一种可调控的或条件倚赖的模式提高这些核酸分子的表达。一些对于 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 活性或表达进行反式作用的负调控子也被连入上述条件性的启动子。这种反式作用的调控子包括反义核酸分子，编码显性抑制分子的核酸分子，以及对 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 核酸特异性的核糖酶分子等等。这些非人类转基因动物对于指导由于提高或降低了的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 表达所形成的症状的诊断或治疗效果的生理生化作用实验是很有帮助的。其它用途对本领域技术人员来说是明显的。

本发明也关注基因治疗，体外基因治疗在美国专利 5,399,346 中有所概括，以及提交的专利案卷历史中，它们是公众可得到的。它包括在体外为含有缺陷基因的个体细胞中引入一个该基因的功能性拷贝，并且再将这个经遗传工程处理的细胞送回到该个体中。该基因的功能性拷贝由一调控元件控制，使得该基因在所述遗传工程细胞中得以表达。大量的转染和转导技术以及适当的表达载体对本领域技术人员是很熟悉的，其中某些描述于 PCT 申请 WO95/0654。使用载体如腺病毒、反转录病毒、疱疹病毒以及靶向脂质体在体内的基因治疗也是基于这一发明。

本发明还提供了一种高效的鉴定在 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 调节细胞功能水平上具有活性的药理试剂或为可作为该试剂活性化合物。该功能特别之 p53 的结合活性及凋亡。一般来说，这种筛选方法包括确定化合物与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 互作活性，包括 p53 的结合等，尽管该方法

也用来测定可以增强 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的活性的化合物。该方法也适于进行自动化和高通量的化合物的筛选。这种通过筛选方法对药理试剂检测的靶治疗指示只限于那些靶细胞功能与通过改变含 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或其片段以及一种或多种天然的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 细胞内结合靶(如 p53) 的复合物的形成有关的情形。靶的指示信号包括凋亡。

本发明还提供了药理试剂的多种检测, 包括标记的体外蛋白-蛋白检测, 电泳位移检测, 免疫测定, 基于细胞的二维或三维杂交扫描检测, 表达检测等。杂交扫描用于是由于检测转快速测定与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或片段与特定内靶细胞相结合的转染核酸的效率。转染的核酸可以编码, 比如组合肽文库或反义分子。常规的检测试剂比如 GAL4 融合蛋白是本领域熟知的。可以效法基于细胞水平的检测, 将融合到 GAL4 DNA 结合区的编码 ASP 多肽的核酸, 和以与融合到转录活性区如 VP16 的 ASP 互作的编码 p53 区域的核酸, 转染细胞。该细胞也包含了连入基因表达调控区中的报道基因, 比如一个或多个 GAL4 结合位点。当 ASP 以及 p53 融合多肽结合后, GAL4 DNA 结合域就与 VP16 的转录活性区相互靠近, 报道基因的转录被激活, 从而引起报道基因的转录。调节 ASP 多肽介导细胞功能的试剂多肽可以通过报道基因的表达变化而被检测出来。鉴定报道基因表达变化的方法是本领域的常规技术。

当 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 片段不是通过转染的核酸生产出来时, 它们在本发明方法中是作为一个分离的多肽被加入检测混合物中。尽管这 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽也可以通过生物抽提出来, 但优选是由重组产生。重组产生的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽包括含有与其它多肽融合的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽的嵌合蛋白, 比如可以提供或加强蛋白间结合, 序列特异的核酸结合(如 GAL4), 加强 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽在检测条件下稳定性或提供可检测的部分, 如 GFP 或 Flag 抗原决定簇标记蛋白的多肽。

检测混合物中包括天然的细胞内的 ASP 结合靶, 比如 p53 或者可以和 ASP 互作的片段。可使用天然 ASP 结合靶蛋白, 经常是使用其部分(如肽或核酸片段), 或者其类似物(主要是为进行检测目的而模仿了天然结

合靶的 ASP 结合特性), 只要所述部分或其类似物在检测中, 提供与 ASP 片段可测的亲合性和亲合力。

检测混合物中还包括一些候选的药理试剂。典型地, 用多种检测混合物与不同浓度的试剂平行试验得到各种浓度下的检测效果。一般, 我们选用其中的一个浓度作为负对照, 即试剂低于检测限的浓度或零浓度。这些候选试剂包括各种化学物质, 特别是有机化合物。优选地, 这些候选药理试剂是分子量较小的有机化合物, 即大于 50 而小于约 2500, 优选小于约 1000, 较优选小于约 500。候选试剂包括具有可以与多肽或核酸进行互作的必须的化学官能团, 典型地包括至少胺, 羰基, 羟基或羧基, 优选至少两个化学官能团, 较优选为至少三个化学官能团。这些药理试剂可以包含有碳环或杂环结构, 和/或由一个或多个上述提及的官能团取代的芳环或多芳环结构。候选试剂也可以是一些生物分子, 比如: 肽、糖类、脂肽酸、甾醇、类异戊二烯、嘌呤、嘧啶, 其衍生物或其结构类似物, 或它们的结合物。如果所述试剂是核酸, 则一般是 DNA 或 RNA 分子, 也可是在此定义的经修饰的核酸分子。

候选试剂可以从多种来源中获得, 包括人工合成的和天然的化合物文库。例如, 通过多种随机或特定的有机化合物和生物分子的合成来获得, 包括随机寡核苷酸的表达, 合成的有机组合文库, 随机肽的噬菌体呈现文库等。天然化合物包括细菌、真菌、动物和植物的抽提物的文库是可得到的, 也是容易制备的。此外, 这些天然的或合成的文库或化合物可以通过常规的化学、物理或分子生物学手段加以修饰。还有, 可以通过直接或随机化学修饰这些药理试剂生产其结构类似物, 例如, 酰基化, 烷基化, 酯基化, 酰胺化等。

其它的试剂也可包括在混合物中。它们包括盐、缓冲剂、中性蛋白 (如清蛋白)、清洁剂等, 将利于优化蛋白-蛋白互作或蛋白与核酸互作。这些试剂会减少反应组分的非特异性和背景反应。提高检测效率的另外试剂, 如蛋白酶抑制剂, 核酸抑制剂、杀菌剂等诸如此类的物质也可使用。

前述检测物质的混合物物都是要依据条件进行孵育, 由此除了提到的候选药理试剂, ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽与细胞结合靶或其部分或

其类似物的特异结合。加入组分的顺序，孵育时间、温度以及其它检测参数可以容易地预先确定。该实验方法仅包括参数的最优化而不是指检测的基本组成。孵育温度从 4°C-40°C。孵育时间优选为最小化以方便快速的高通量检测，典型地为 0.1-10 小时。

5 在孵育完成以后，可以通过任何对使用者方便的常规方法检测 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽与一个或多个结合靶特异结合存在与否。对于细胞自由结合型检测，需要增加一个将结合与未结合组分分离开的分离步骤。这种分离工艺可以通过多种方式完成。方便的是将至少以种族分固定在固体基体上，这样，非结合部分就很容易被分离掉。这些固体
10 基体可以由不同的材料制成不同的形状，象微孔板、微珠、量液棒、树脂颗粒等。它们的选材主要基于最大的信噪比，较小的背景结合，从而利于分离且成本低。

分离方法要受因素的影响，比如从样本池中移除微珠或量液棒，清除或稀释样本池，比如微空板孔、沉淀微珠、颗粒，层吸柱或以洗液或
15 溶剂过滤。分离步骤优选包括多步的沉淀和清洗。比如固体基是微孔板，可以用含有不参与特异结合的如盐、缓冲液、去污剂和一些非特异性蛋白的常规孵育组分的洗液洗板孔若干次。如果固体基是磁珠，它可以用洗液漂洗一次到数次，并用磁铁吸附分离。

对于细胞基检测可用任何常规的方式进行，如双式三杂交扫描。在
20 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 与靶分子作用的报道基因转录检测中引起的转录典型地编码直接或间接可检的产物，如 β -gal 的活性，荧光素酶的活性等等。对于细胞自由结合检测中，组分之一常包括或耦合到一个可检测的标签。现在有多种标签可供选用，比如直接检出的（如放射性、荧光、光密度或电子密度等）；或间接检出的（如抗原决定簇标签，象 FLAG 抗
25 原决定簇标签，酶标记标签如辣根过氧化物酶等）。这些标记需要可以与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的结合配对物相结合，或者整合到其结合配对物结构中。

对于标签检测有不同的方法，主要是基于标签及其它检测组分的性质。例如这些标签当与固体基质结合或分离后可被检测出来。标签可以
30 通过光密度或电子密度直接检测，直接检测放射性的放射量或非放射的

能量转移等。当然，也可以通过间接手段检测，如抗体偶联，链霉素和生物素偶联等。这些都是常规技术。

本发明提供 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 特异结合试剂，鉴定以及制备这些试剂的方法，它们在诊断、治疗和药物研究中的使用。例如 ASP-1、
5 ASP-2 或 I-ASP 特异药理试剂可用于多种诊断和治疗中，特别是对于涉及到有关 ASP 通路的不适使用相关的疾病或疾病预防，比如细胞凋亡等。新的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的特异结合试剂包括 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 特异结合抗体或其它天然的细胞内结合试剂。通过双杂交的方法检测，对于非天然的细胞内结合试剂通过化学文库的方法来确定。

10 一般来说，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 与一种结合试剂的结合的特异性常表现出一个稳定的结合常数。对于与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽选择性结合靶的稳定常数至小浓度约 10^7M^{-1} ，优选是至少约 10^8M^{-1} ，最好约 10^9M^{-1} 。多种基于细胞和无细胞检测可用于体现 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的特异结合。基于细胞的检测包括其中 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 介导转录
15 的抑制或升高的一、二或三杂交扫描。无细胞检测分为 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 蛋白结合检测和免疫测定等。其它用于筛选与 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽结合的试剂的检测包括荧光共振能量转移 (FRET) 和凝胶阻滞电泳分析 (EMSA)。

根据是否将核酸导入到宿主体内或体外，使用了不同的技术将本发
20 明的核酸导入细胞。所述技术包括磷酸钙-核酸共沉淀转染，与 DEAE 相关的核酸转染，与包含目标核酸的反转录病毒相关的转染，脂质体介导转录等多种方法。对于特定的用途，优选将核酸导入特定的细胞。在此情况下，通过本发明的核酸导入到细胞（如反转录病毒或其它病毒，脂质体）中的载体可具有一个附在其上的靶定分子。例如靶细胞上对表
25 膜蛋白特异识别的抗体分子或靶细胞受体的配体可以被结合到或整合入核酸传送载体。例如，当脂质体被用来导入本发明的核酸时，与内吞相关细胞膜蛋白结合的蛋白可被整合入脂质体的结构中，以便实现靶定和/或方便进入细胞。这些蛋白包括对特定细胞型有向性的衣壳蛋白或其片段，蛋白内循环的抗体，细胞内定位蛋白以及延长细胞内半衰期的蛋白
30 等。如本领域技术人员熟知的，聚合物传送系统已成功地将核酸传递如

细胞。应用该系统，甚至通过口服也可传送核酸。

当给药时，本发明的组合物以药物学上可接受的制剂形式给药。这些制剂通常药物学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容介质，以及有免疫辅助能力的试剂如佐剂、细胞因子，及任选的其它治疗试剂如化疗剂。

本发明的治疗剂可以通过常规的方法给药，如注射或逐级渗透。也可以通过口服、静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、心内注射、皮下注射或脑内注射。如果是用抗体进行治疗，优选采用肺喷雾的方法给药。这种制备含抗体气雾剂传递系统对本领域技术人员是一种成熟技术。通常，这种系统必须使用不会显著降低抗体的生物学活性的组分，如抗体决定簇的结合能力（Sciarra & Cutie, 气雾剂, Rimington's Pharmaceutical Science, 18 版, 1990, pp1694-1712）。本领域技术人员无需额外的实验，便可容易地决定生产抗体气雾剂的参数和条件。当使用本发明的反义制剂时，缓慢的静脉给药是优选的。

本发明的组合物以有效量给药。“有效量”是指组合物单独或与其它药剂使用时得到预期效果。在治疗特定疾病如癌症的情况下，预期的效果是抑制疾病的恶化。它可包括暂时性的减缓疾病的发展，更好的是永久阻止疾病的发展。这可以通过常规方法监测或用本发明涉及的诊断方法监测。

当然，这种剂量是依赖于治疗的特定病症，病症的严重程度，患者的自身状况（包括年龄、身体状况、身材及体重等），治疗周期，共治疗的情况（如有）。给药的特定途径以及医护人员的专业知识及技能。这些因素都是本领域的常规技术，不需要更多的实验即可获得。一般最优选择是使用单组分或联合组分的最大剂量，其最高的安全剂量遵从医嘱。然而本领域技术人员可以理解，基于药学、心理学或其它可能的原因，患者可以持续使用较低的剂量或可允许的剂量。

前述的方法中所用的药物组合物优选经过无菌的，在适合于患者给药的重量剂量或体积剂量中含有有效量的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 或编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的核酸，以产生预期效果。这种效果如可以通过这里描述的报道系统来检测 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物对信号转导的

增强还是抑制；通过检测象基因表达等下游效果；或检测 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物的生理效果，如肿瘤的抑制、病征的减弱及调控凋亡等。与之相似，反义的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 分子用于检测用反义组合物处理的细胞内个体基因的表达。其它很多测定对本领域技术人员是已知的并可对用来检测反应（效果）。

ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或核酸对个体的使用剂量根据不同的参数选择，特别是与使用方式及个体的状态相关。其它的因素包括预期要进行治疗的时间。如果初始使用的剂量效果不很显著，在患者可以忍受的范围内，可使用较高剂量（或是有效高剂量，通过不同的多个传递途径）。

一般来说，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 以现有技术中任意的标准方法形成制剂，并以 1ng-1mg 剂量给药，优选范围为 10ng-100 μ g。在使用编码 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的核酸或其变异体时，按照标准方法制剂成 1ng-0.1mg 剂量给药。其它 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物的给药方案对本领域技术人员是已知的，其中剂量、注射时间、注射部位、注射方式（如肿瘤内注射）等，依据前述变化。除了在人体上应用外，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物还应用于其它哺乳动物，以进行实验或兽医治疗的目的，可基本上按上述条件进行。施用对象是哺乳动物，优选是人类，此外还包括非人类的灵长类、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫及啮齿类动物。

在给药时，本发明的药物制剂以药物上可接受的剂量和药物上可接受组合物形式应用。术语“药物（上）可接受的”是指没有毒性成分，它不会干扰活性成分的生物活性效果。所述制剂通常含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容载体和任意的其它治疗剂。作为药物使用，要求盐是药物可接受的，非药物可接受的盐可以用于配制成药物可接受的盐，它们也属于本发明的范围之内。这样的药理和药物可接受的盐包括，但并不限于，由以下的酸制备的那些：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、顺丁烯二酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。药物可接受的盐也可制成碱金属或碱土金属盐，如钠、钾或钙盐。

如果有必要，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物可以与药物可接受的载

体相结合。这里使用的术语“药物可接受的载体”是指一种或多种相容的固体或液体填充剂，稀释剂或成胶囊物质，它们适宜对人类给药。术语“载体”是指由有机或无机成分，天然或合成的，可以与活性成分相结合并方便使用的物质。药物组合物的成分也可与本发明的分子共混，或相互混合，但不会导致各成分的相互作用而减弱预期的药物活性。

药用组合物可包括适宜的缓冲液，包括其盐中的醋酸、其盐中的柠檬酸、其盐中的硼酸及其盐中的磷酸等。

药用组合物可任意包括适宜的防腐剂，如杀藻胺、氯丁醇、对羟基苯甲酸酯及乙基汞硫代水杨酸钠。

药用组合物可方便的使用单位剂量形式，可以用制药技术中任意已知的方法配制。所有方法都包括把活性物质与由一种或多种作为附加成分的载体结合。一般来说，这些组合物通过将活性化合物与液体载体、细分的固体载体、或两者混合形成均一的混合物，如果有必要，还可形成特定形状的产品。

那些适合口服给药的组合物可以为各种单位，如胶囊、片剂、锭剂等，它们均含有预定量的活性化合物。其它组合物有水中悬浮液或非水液体如糖浆、药酒或乳剂。

对于适合于胃肠外给药的组合物方便包括 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或核酸无菌水或非水的制剂，优选与受者血液等渗。所述制剂使用适当的分散剂或湿润剂或悬浮剂根据已知方法配制。无菌的可注射制剂也可由无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂如 1,3-丁二醇中制成可注射的溶液或悬浮液。在可接受的载体中，可以使用水、林格液及等渗的氯化钠溶液。此外，无菌固定油也可以作为溶剂或悬浮介质。为此目的，无刺激性固定油也会被利用。如单或二甘油脂。此外一些脂肪酸如油酸也可被用于制备注射制剂。适合于口服、皮下注射、静脉注射、肌肉注射的载体制剂的给药参见 Rimington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co., Easton, PA.

本发明的另一方面，ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 多肽或核酸用作生产调控细胞凋亡的药物。这些药物装入小瓶或试剂盒以便治疗个体使用。在某些实施方案中，其它的具有相同效果或影响 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP

组合物的药剂都可以放入该试剂盒，比如一些化疗剂。试剂盒包括说明书或其它说明怎样以试剂盒中的 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 组合物和任何其它组分给药的打印材料。

5 通过下面的具体实施例和图表示例性阐述本发明的实施方案。

图 1A 代表 ASP-1 的 DNA 序列；图 1B 代表 ASP-2 的 DNA 序列；图 1C 代表 ASP-1 的蛋白序列；图 1D 表示 ASP-2 的蛋白序列；图 1E 是 ASP-1 的基因组图谱。

10 图 2A 代表 ASP-1 的 mRNA 的 Northern 印迹结果；图 2B 为 ASP-2 的 mRNA 的 Northern 印迹结果；图 2C 为 ASP-1 及 ASP-2 的 mRNA 的 northern 印迹结果，以及作为对照的肌动蛋白的 mRNA 的 northern 印迹结果

图 3A 为 GST-53BP 的重组 GST-53BP SDS 聚丙烯酰胺凝胶的考马斯亮兰的染色结果；图 3B 为 ASP-2 的单克隆抗体 DX54.10 的 western 印迹结果；图 3C 为 ASP-2 的 western 印迹结果。

图 4A 代表 ASP-2 与 p53 的 western 印迹结果；图 4B 为 ASP-2/Bbp2 质粒的 DNA 序列的部分；4C 示意了 ASP-2 与 ASP-2/Bbp2 的分子量差。

图 5A 显示不同的 p53 特异启动子在 p53、ASP-1 和 ASP-2 结合条件下刺激作用；图 5B 为 ASP-1 和 ASP-2 对 p53 转活性的影响。

图 6 代表 ASP-1 和 ASP-2 对 PIG-3 启动子的激活，包括各种截断的 ASP 多肽表达的 western 印迹结果。

图 7A 为 ASP-1 和 ASP-2 协同 p53 蛋白的凋亡功能；图 7B 为 ASP-2 对 p53 蛋白的凋亡功能的协同作用；图 7C 为含有 C 端的半个 ASP-2 表现了对 p53 蛋白凋亡功能的抑制影响；图 7D 为 ASP-2 协同 p53、p73 和 p63 的凋亡功能。

图 8A 为 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的同源比较。Saos-2 细胞用载体、p53 (5 μ g)、I-ASP (10 μ g) 或 p53 + I-ASP 转染，然后共同孵育 16 小时。细胞在 NP40 溶解缓冲液和 1000 μ g 的 Saos-2 细胞溶胞产物中溶解，用于与结合在谷胱甘肽珠上的 I-ASP 多克隆抗体进行免疫共沉淀。使用兔子

的多抗 p53 抗体 CM1 通过抗原抗体复合物的 western 印迹检测 p53 的存在; 图 8B 中, Saos-2 细胞用 ASP-1 (8 μ g) 或 ASP-2 (4 μ g), I-ASP (5 μ g) 和 p53 (50ng) 转染。40 μ l 的相应在 10% 的胶中电泳。用 V5 抗体检测 ASP-1, 用 DX54.10 检测 ASP-2, I-ASP 由鼠的抗 I-ASP 抗体检测, p53 5 由 DO1 检测, PCNA 由抗 PCNA 抗体检测 (图 8E); 图 8C 显示由 ASP-1 或 ASP-2 诱导的 p53 的凋亡功能, I-ASP 抑制 p53 诱导凋亡功能; 图 8D 显示 ASP-1 和 ASP-2 激活及 I-ASP 抑制 p53 应答启动子, Bax。

图 9A 代表在表达 p53(1 μ g/10cm 碟)或 p53181C(1.6 μ g/10cm 碟)或 p53181L(2 μ g/10cm 碟)的 Saos-2 细胞在 ASP-1(10 μ g/10cm 碟)或 ASP-2 10 (10 μ g/10cm 碟) 是否存在的条件下含有 sub-G1DNA 含量 (凋亡细胞) 的细胞百分数。图 9B 表示在 Saos-2 细胞中, ASP-1 或 ASP-2 (分别为 8 和 4 μ g) 对 p53 及它的两个突变体的转录激活活性的影响, p53(50-75ng) 或 p53181C(50ng)或 p53181L(50ng)对报道基因 Bax-luc 的转录激活。在有 ASP-1 或 ASP-2 存在的条件下, 不同的 p53 结构的转录激活活性是只存 15 在 p53 的不同构建体时的两倍; 图 9C 为 40 μ l 的转录溶胞产物与用抗 -p53(DO1), 抗 ASP-2(DX54.10)及抗 ASP-1(V5)抗体检测的蛋白的 western 印迹结果。

图 10 表示 I-ASP 的 DNA 序列。

图 11 表示 I-ASP 的蛋白序列。

20 图 12 表示 ASP 家族在体内对 p53 的凋亡功能的高度调控。U2OS 和 MCF-7 是野生型 p53 蛋白细胞表达系, 用表达蛋白的质粒转染, 可以和细胞表面标记子的 CD20 (A-E)一同显示。这种转染的细胞通过 FACS 鉴定分析。条状图显示了含有 sub-G1 这种凋亡特征 DNA 的转染细胞的百分比。产生 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的反义 RNA 的质粒标记为 α -ASP-1、 25 α -ASP-2 或 α -I-ASP。人 HPC16 的病毒致癌蛋白 E6 记为 E6。图 12B、12D 中细胞是由质粒转染。然后, 这些转染了的 U2OS 和 MCF-7 细胞在含有抗癌药物顺铂浓度为 5 和 3 μ g/ml 的培养液中培养。30 小时后, 收集细胞进行分析。对 F 和 G, U2OS 和 MCF-7 细胞都是由表达蛋白的质粒转染的。细胞固定后, 通过两次免疫荧光标记, 图 12G 中显现出 ASP 或 p53 30 与内源的 Bax 或 mdm2 的共表达。图 12F 是 200 个 U2OS 或 MCF-7 只转

染载体或 ASP 质粒，用于检测过量的内源 Bax 的过量表达。条状图是至少三次独立实验的平均结果。

图 13A 表明 ASP 家族成员与 p65、I κ B 和 p53 的互作。图 13B 是在 Saos 细胞中表达或共表达编码 ASP-2、I κ B 及 p53 诱导凋亡的状况。图 13C 和 13D 表明 I κ B 在 ASP-2 存在或不存在的条件下，对 p53 蛋白在 Bax 及 mdm2 启动子上的转录激活功能的调节能力。

图 14A 图示为野生型 p65 与删除突变 Δ p65 对报道报道质粒 NF κ B 的转录激活能力；图 14B 图示表达或共表达 p53、ASP-2、p65 及 Δ p65 对细胞的诱导凋亡。

图 15A 图示 Bcl-2 对 ASP-1 及 ASP-2 在 p53H175-L 诱导凋亡的刺激抑制能力。图 15B 图示 Bcl-XL 对 ASP-1 及 ASP-2 在 p53H175-L 的无效抑制；图 15C 说明 Bcl-2 对通过 ASP-1、ASP-2 进行的 p53 诱导凋亡的抑制作用。

图 16 说明 I-ASP 对 E7 的转换功能的增强；图 16B 说明 I-ASP 增强细胞对顺铂的抵抗作用。

表 1 代表从 40 对正常的及 I 级和 II 级表达野生型 p53 的乳腺癌中获得的 RNA 样本，并对其进行 ASP-1、ASP-2 或 I-ASP 的 mRNA 表达情况进行汇总。

20 实施例 1

为了了解 ASP 家族如何在体内行使功能，我们使用 northern 印迹的方法对表达 ASP-1 和 ASP-2 的组织进行区别并加以研究。如图 2A 和 2B，ASP-1 和 ASP-2 的 mRNA 在人的所有组织中均有表达，是一条 5.5-5kb 的特异转录带，但是 ASP-1 和 ASP-2 的表达量有所不同。在心脏、骨骼肌及肾脏中 ASP-1 和 ASP-2 都有最高的表达。有趣的是，ASP-1 和 ASP-2 的表达方式有一些小小的不同。ASP-1 在心脏有高水平的表达，比在骨骼肌及肾脏中要高出许多。而 ASP-2 在心脏、骨骼肌及肾脏中的表达水平是相似的。此外，在人的肝脏组织中也可以检测到 ASP-1 的高水平的表达。

30

实施例 2

已知 ASP 家族成员在其 mRNA 水平上具有特异组织分布模式，重要的是研究如何控制它们在蛋白水平上的表达。我们使用 GST 融合蛋白产生对 ASP-2 的抗体。将 ASP-2 跨过第 698-1135 氨基酸的编码区亚克隆到细菌表达质粒 pGHX2TK 的 EcoR I 位点。这样，74kDa 的 GST-ASP-2 (698-1135 氨基酸) 的蛋白产生了 (如图 3A)。用 GST-53BP2 蛋白免疫兔子和小鼠。从兔子和小鼠中获得的抗血清用转染了表达 ASP-2 片段的质粒 pCMV Bam neo ASP-2/53BP2 (607-1135) 的 Saos-2 的细胞裂解液进行检测。pCMV Bam neo ASP-2/53BP2 (607-1135) 是由包括抗原决定簇 9E10 的 ASP-2 的 PCR 产物插入到 Bam H I 的位点构建而成的。通过转染表达 ASP-2 或对照质粒的 Saos-2 细胞裂解液进行检测。兔子的多抗 pAbASP-2/77 及小鼠的单抗 DX54-10 与 DX54-7 被鉴定出来，如图 3B 所示。小鼠的单抗 DX54.10 不与 GST 发生交叉反应，只是识别 Saos-2 裂解液中的 ASP-2。DX54.10 只是识别转染 ASP-2 或 GST-ASP-2 而对 GST-p27 融合蛋白不与识别。说明其对 ASP-2 的识别是特异的。

由于单抗对 Saos-2 细胞中转染产生的 ASP-2 有特异的识别，使得我们可以在第一时间对内源表达的 ASP-2 进行研究。为了确定与抗体结合的反应带确实是内源 ASP-2，用抗体 DX54.10 上清液与结合到谷光甘肽珠上的 GST 蛋白或 GST-53BP2 蛋白进行反应，将这些珠在 DX54.10 的上清液中在转轮上孵育 1 小时，然后弃去旧珠，换用新珠，如此反复 3 次。图 3C 显示了转染的 ASP-2/53BP2 片段 (607-1135) 及其与上述的与珠孵育过的上清液进行反应，其中出现了特异条带的的孵育 GST 珠的上清液而不是孵育 GST-ASP-2 珠的上清液。这表明 DX54.10 与 293 个细胞及 Tero 细胞全裂解液中特异识别的蛋白是内源的 ASP-2，并且 DX54.10 对该蛋白有特异识别的功能。

实施例 3

使用上述的抗 ASP-2 抗体，我们主要通过外源蛋白表达研究体内的 p53 是否与 ASP-2 互作。将表达质粒转染入 Saos-2 细胞，并使用抗 ASP-2 抗体 DX54.10 及对照抗体 pAb423 (一种对 SV40 巨 T-抗原的抗体) 与之进

行免疫共沉淀。如图 4A, 通过 western 印迹分析首次显示了 p53 与 ASP-2 的免疫复合物, 表明体内 p53 与 ASP-2 是互作的。这种互作是特异的, 因为对照抗体并没有显示 p53 或 ASP-2。在该图中有一个矛盾的地方就是内源的 ASP-2 与转染的 ASP-2 (现在知道是 bBP2(130-1135)) 蛋白在 SDS PAGE 的位移不同, 其中一个可以解释的原因是基于 bBP2 的序列, 在它的序列中有两个潜在的 ATG 密码子, 表现为其 cDNA 为 571 和 757。其中 757 的密码子是在体外的转录 - 翻译共同进行中使用的, 其编码蛋白大小为 1005 个氨基酸。而表达质粒 53BP2/bBP2 cDNA 就是以 757 的密码子作为起始进行构建的 (Naumovski and Cleary, 1996)。但是, 基于图 4A 的结果, 事实上蛋白在体外的转录并不是从 757 的密码子开始的。将 bBP2 的 5'端进行网上比对(BLAST search)发现 bBP2 的 412bp - 514bp 与载体有很高的同源性。通过对 ASP-2/bBP2 质粒重新测序, 我们发现这样的序列并不存在于 4B 的图中。因为在 bBP2 的 412bp - 514bp 的区段中有终止密码而在该部分序列中没有, 这使我们认为 ASP-2 的启动位点在上游的 757 位。通过与老鼠的 ASP-2 进行比较(用人的 ASP-2 的 cDNA 筛库得到), 我们认为 ASP-2 的起始点在新的 ASP-2 的 cDNA 的 246bp。这使得 ASP-2 是一个具有 1135 个氨基酸较大的内源蛋白。

为了深入研究, 含有两个 ATG 起始位(412bp - 514bp)的 53BP2/Bbp2 cDNA 克隆到哺乳动物表达载体 pcDNA3 中。最终的 pcDNA3-ASP-2/bBP2 质粒 (1-1135) 被转染到 Saos-2 细胞并表达内源和外源的 ASP-2, 并被其抗体 DX54-10 检出。如图 4C 所示, pcDNA3-ASP-2 表达产物 ASP-2 的分子量与内源的 ASP-2 相同。从此结果, 我们认为内源的 ASP-2 使用第一个 ATG, 并且全长包括 1135 个氨基酸。依此结果, 我们很有必要定义一下克隆的名称以与它们的实际序列相对应。ASP-2 是代表具有全长 1135 个氨基酸的蛋白。ASP-2/bBP2 与 ASP-2/53BP2 分别代表 130-1135 及 607-1135 氨基酸的蛋白。

此外, 如图 4A 所示, 内源的 ASP-2 或 ASP-2/bBP2 都可以在体内与 p53 互作。

30 实施例 4

p53 是一个转录因子，它所转录激活的靶基因包括 mdm-2, Bax 以及 cyclin G, 并且数目成上升势头。最初分离 ASP-2/53BP2 在某种程度上是作为一个抑制 p53 的因子，因为它可以抑制 p53 的 DNA 靶定活性，主要是因为它可以在体外与 p53 的 DNA 靶定中心相结合 (Iwabuchi 等., 1993)。所以 5 对于 p53, ASP-2/53BP2 可以是细胞内的 SV40 肿瘤病毒的大抗原等同物。所以有人预测 ASP-2 应该有致癌基因的活性。但是 ASP-2/53BP2 的行为却表明它对肿瘤的抑制生长的作用比促进活性要强 (Naumovski and Cleary, 1996)。这种差异可被归结到最初的 ASP-2/53BP2 克隆只具有 C-端部分的蛋白。很可能是从 C-末端开始到全 10 长的 ASP-2 蛋白对 p53 蛋白具有不同的功能。我们也不清楚 ASP-1 对 p53 蛋白有什么影响。

为了揭示 ASP 家族成员对 p53 活性产生的影响，我们首先研究了在转录报道基因检测中的依赖 p53 的转录活性。将五个 p53 报道质粒转入对 p53 无反应的细胞中，它们是由 p53 的启动子中得到的靶定基因： 15 mdm-2、Bax、cyclin G 和 p21Waf-1 以及一个合成的启动子结构 PG 并启动荧光素酶的表达。通过体外 DNA 结合实验及对突变 p53 的转录激活功能的研究，将一些已知的与 p53 靶定的结合位点分为两类 (Ludwig *et al.*, 1996)。类 Bax 位点对 p53 的转录刺激很弱，而类 mdm2 位点可以被 p53 20 高效刺激。有趣的是，与 p53 共表达 ASP-1 或 ASP-2 将使 p53 对 Bax 启动子的刺激增强 10-50 倍。与之对应的是，与 p53 共表达 ASP-1 或 ASP-2 对 mdm2 及 cyclin G 的启动活性的刺激是非常平和的 (图 5A)。ASP-2/53BP2 对 mdm 2 及 cyclin G 启动子没有刺激作用，对 p21Waf-1 及 PG 的作用也是很弱的。

ASP-2/53BP2 可以特异的激活 Bax 启动子活性而不是 mdm2 第一次 25 表明 p53 特异启动子是在细胞内进行调控的。由于 Bax 是 p53 前细胞凋亡的靶基因，我们不禁要问是否 ASP 家族可以特异性的刺激那些已知的启动细胞凋亡的 p53 靶基因的转录活性。PIG-3 就是这样的一个基因。通过瞬间转染报道基因的检测，如图 5A，我们可以实现 ASP-1 和 ASP-2 对 PIG-3 转录活性的特异性调控。

30 最近表明，p53 的转录激活功能可以被一个常规的转录辅激活蛋白激

活。这引起我们极大的兴趣，是否 ASP 家族成员也象 p300/CBP 类蛋白一样，并不只对 p53 特异，而是可以激活大量的转录因子。其中被验证的一个转录因子是 E2F1。象 p53 一样，E2F1 的转录激活功能可以被 p300/CBP 的共表达所激活。但是与 p300/CBP 共表达 ASP-1 或 ASP-2 不能激活几种已知的报道启动子的转录激活功能。包括 cyclin A、b-myb 以及合成的启动子 3xwt (图 5B)。这一结果表明 ASP-1 和 ASP-2 特异性的调节 p53 的转录激活功能。既然这个常规的转录激活蛋白 p300/CBP 可以结合并刺激 p53 和 E2F1 的转录激活功能，这暗示了 ASP-1 和 ASP-2 二者都可以独立地刺激 p300/CBP 所刺激的 p53 的转录激活功能。

10

实施例 5

我们知道共表达 ASP 可以特异性的刺激 p53 的转录激活功能，那么确定具有活性的 ASP 所需的最小区域就是很重要的。我们使用了三种版本的 ASP-2 来鉴定它们对于 p53 的转录激活功能的影响差异。正如预料的，全长的 ASP-2 (1135aa) 可以刺激 p53 的转录激活功能达 7 倍，有趣的是，共表达 (1105aa) 只刺激 p53 的转录激活功能达 2 倍，此外共表达 ASP-2/53BP2 (607-1135aa) 减弱了刺激 p53 的转录激活功能达 50% (图 6)。ASP-2/bBP2 的这种减弱并不是由于表达不足 (图 6A)，这是由于 ASP-2/bBP2 只缺少了 ASP-2 前面的 130 个氨基酸所导致的。这些数据表明全长的蛋白对于 ASP 特异性的刺激 p53 的转录激活功能是必须的。ASP-2/53BP2 的刺激 p53 的转录激活功能的减弱表明它可以作为一种显性抑制突变抑制 ASP-2 的刺激 p53 的转录激活功能的活性。

15

20

实施例 6

ASP-1 和 ASP-2 有特异的刺激 p53 在 Bax 和 PIG-3 启动子的转录激活功能，可以预料，当 ASP-1 和 ASP-2 共表达可以增强 p53 的诱导细胞凋亡。我们假设如果 ASP-1 和 ASP-2 的刺激 p53 的转录激活功能是经它们自身实现的，那么它们自己将对 Bax 凋亡功能的影响是很微弱的。我们在 Saos-2 细胞中验证我们的假设，并表达低水平的 ASP-2，这种细胞是没有 p53 的。在这一实验中要检测 p53 的量，由于要通过滴定来检测，

25

30

所以 17% 的转染的细胞凋亡了。我们通过共转染细胞表面标记子 CD20 来确定凋亡。有趣的是，单独表达 ASP-1 或 ASP-2 只引起低水平的凋亡，根据观察，单独的 ASP-1 或 ASP-2 只可以很弱的促进 Bax 启动子的活性，所以更可能的是 ASP-1 和 ASP-2 在 p76 和 p63 作用效果。共表达 p53 与 ASP-1 或 ASP-2 却导致了凋亡致死的细胞显著升高。接近 50% 的转染细胞死于凋亡（图 7A）。这种增强凋亡的协同作用特异于 p53，因为共表达 E2F1 与 ASP-1 或 ASP-2 只是导致了凋亡致死的细胞的百分比有一点提高（图 7B）。

我们也使用 ASP-2 的突变体 ASP-2/53BP2 来验证 ASP 通过增强 p53 的转录激活功能从而刺激了 p53 的凋亡功能的假设。ASP-2/53BP2 是用来在 Bax 启动子上抑制 ASP-2 的刺激 p53 的转录激活功能。并且希望当 ASP-2、ASP-2/53BP2 与 p53 共表达后 p53 的凋亡功能不会增强。事实就是这样的。当 p53 与 ASP-2 共表达导致了接近 50% 的转染细胞死于凋亡，但是当 ASP-2、ASP-2/53BP2 与 p53 共表达后，只有 30% 的细胞死于凋亡。这就说明 ASP-2 只可以通过增强 p53 的转录激活功能从而刺激了 p53 的凋亡功能（图 7C）。

我们也研究了 ASP 对于 p53 家族成员，p73 和 p63，的凋亡功能的影响。结果示于图 7D。共表达 ASP-1 或 ASP-2 可以增强 p53 家族所有成员的凋亡功能的影响。这说明 ASP 家族是一个新的肿瘤抑制家族。

20

实施例 7

最近分离到的一个序列 reL 相关抑制子 (RAI)，它被确定为一个有 315 氨基酸的 p65 rel 结合蛋白。它的与 C 端的半段 ASP-1 或 ASP-2 序列同源（图 8A）。如 ASP-2 的突变体 53BP2/ ASP-2 (600-1128) 并表现出如下特征。RAI 没有 ASP-1 或 ASP-2 的 α 螺旋域但却有一个富含脯氨酸的区域，ankryin 重复和 SH3 域。在 RAI 中也有 ASP-2 的与 p53 接触的残基。为了研究 RAI，我们命名它为 I-ASP，并将其编码区克隆到哺乳动物表达载体 pcDNA3 上。我们也合成了 I-ASP 中的肽段 (RLQPALPPEAQSVPELEE)，该片段在 ASP-1 或 ASP-2 中没有相似序列。对这段肽的老鼠的特异抗体不与 ASP-1 或 ASP-2 发生交叉反应（数

30

据未给出)。用该抗体与转染了 I-ASP 的 Saos-2 细胞免疫共沉淀结果表明 I-ASP 也可以与 p53 互作 (图 8B)。象 ASP-2 的突变体 53BP2/ ASP-2 (600-1128), 单独表达 I-ASP 不会引起细胞凋亡。I-ASP 与 p53 共表达则会引起轻微的 p53 的凋亡功能的抑制。当 ASP-1 或 ASP-2 与它们共表
5 达时, I-ASP 对 p53 的凋亡功能表现显著影响。在图 8C 中证实了这一点, 共表达的 I-ASP 抑制了 ASP-1 或 ASP-2 引起的 p53 的凋亡功能的增强。当 I-ASP 与 ASP-1 或 ASP-2 共表达, I-ASP 废除了 ASP-1 或 ASP-2 在 Bax 启动子的增强 p53 的凋亡功能的活性 (图 8D)。共表达 I-ASP 并不显著改变 p53 或 ASP 的表达水平 (图 8E)。这些结果说明在体内 ASP-1 和 ASP-2
10 的前 - 凋亡功能可以被天然的 I-ASP 所抑制。这种 ASP-1、ASP-2 和 I-ASP 表达水平的平衡决定了细胞的命运, 比如生存还是死亡。

实施例 8

最近的研究表明一些 p53 的凋亡缺陷突变可以转录激活许多 p53 靶
15 基因启动子, 包括 mdm2、p21waf1, 但是对于前凋亡基因象 Bax、PIG-3 和 IGF-BP3。在所有研究的 p53 的凋亡缺陷突变中, 181L 和 181C 备受
关注。p53 的 181 位残基的突变在人的许多肿瘤型中都有报道, 包括乳腺癌和子宫癌。通过 p53 和 53BP2 的结晶结构, 这个 p53 的 181 残基被确
定为 p53 与 53BP2 的作用位点, 该位点不是 DNA 作用位点。为了证实晶
20 体结构的预言, 前期实验表明 181L 和 181C 都可以结合 DNA 并且可与
许多 p53 靶基因启动子结合, 包括 mdm2、p21waf1。但是有趣的是这两个突变的诱导凋亡的能力及抑制变形能力都下降。既然 ASP 与 p53 可以
特异的增强 p53 的凋亡功能, 我们假定 181L 和 181C 的减弱凋亡功能可
能是基于在这两个突变上缺乏与 ASP 诱导凋亡的共同操作。我们检测了
25 ASP 与这两个来源于肿瘤的 p53 突变, 181L 和 181C 的凋亡诱导功能。
如图 9A 所示, 共表达 ASP-1 或 ASP-2 不能增强 p53 突变的凋亡功能,
而在相同的实验中, 共表达 ASP 则显著地提高野生型 p53 的细胞凋亡的
功能。随后, 我们也测试了 ASP 对 p53 反式激活功能的影响。与我们所
观察到的突变的 181 残基能够影响 ASP 活化的 p53 介导的凋亡的能力相
30 一致, ASP-1 或 ASP-2 的共表达不能够刺激突变的 p53、181C 在 BAX 基

因启动子区的反式激活功能。ASP对突变的p53和181L的影响也相似。ASP之所以不能激活p53突变体并非由于缺乏蛋白的表达。所有这些结果表明：ASP-1、ASP-2不能够刺激两种与凋亡前基因相关的两种p53突变体的反式激活功能可能提供了一种分子机制。在诱导的凋亡的过程中通过这种机制这两种突变的p53分子得到了保护。这也可以解释为什么在人类的一些肿瘤中，突变位点发生在p53座位上。这些结果还表明了ASP的共激活功能对于p53的肿瘤抑制功能的重要作用。

实施例9.

10 在人类的肿瘤细胞中发现所有四种与p53部分相连的53BP2都发生了突变。我们知道ASP-1和ASP-2的表达可以显著地增强P53的凋亡功能。这表明：在人的肿瘤细胞中ASP-1、ASP-2的表达水平可以负调控野生型p53的表达。与此观点相符，通过基因排列分析发现在一种极度恶性的人乳腺癌细胞中ASP-2的表达降低了。为了提供进一步的体内证据，我们使用一种半量反转录PCR技术来分析一组配对的正常人的RNA及15 40个乳腺癌病人的肿瘤细胞RNA来研究ASP-1和ASP-2的表达情况。应该强调的是：40个乳腺癌细胞中都有野生型p53的表达。在人的乳腺癌细胞中ASP-1、ASP-2的表达水平经常降低(表1和图9D的代表数据)。在40个癌样品中24个表达了ASP-1，9个表达了ASP-2。有趣的是：8/9的肿瘤细胞在ASP-2表达减少的同时ASP-1的表达也减少。这种表达模式好象说明ASP-1的负选择压要高于ASP-2。这与受测试的40个乳腺癌病人的实际情况一致。在该实验中ASP-1的表达显著减少(大于75%的信号减少)或根本不表达的情况发生的频率要高于ASP-2，分别为60%和22.5%。鉴于同一个体中正常组织和癌组织ASP-1和ASP-2表达水平的显著差异，我们认为在肿瘤细胞中存在一种ASP-1、ASP-2表达丧失的选择优势。这些结果与我们前面观察到的现象也是一致的，ASP结合削弱的p53突变体181L和181C即使在ASP存在的情况下也不能有效地诱导凋亡。我们的实验支持这样的观点：在人类乳腺癌中ASP家族蛋白起抑制肿瘤生成的作用。

30 与ASP-1、ASP-2相比，在正常的及所测试的人乳腺组织中I-ASP

的表达量通常要低。然而，与正常组织相比在 8 个肿瘤组织中发现了 I-ASP 的过量表达。更惊奇的现象是 I-ASP 的过量表达与 ASP-1、ASP-2 的正常表达相关连。在 7 种 I-ASP 过量表达的肿瘤中没有发现任何 ASP-1、ASP-2 表达的降低。这种结果支持 I-ASP 在体内上作为 ASP-1、ASP-2 的天然抑制物的生物重要性。

实施例 10

为了研究内源性的 ASP 家族成员在调控内源 p53 诱导的凋亡中的作用，我们把 ASP-1、ASP-2 导入表达野生型 p53 的两种细胞系中。当 ASP-1、ASP-2 在这些细胞中表达时可以诱发细胞的程序性死亡。从人类乳头癌病毒中获得的病毒癌蛋白 E6 可以与 P53 结合并且有效的使之降解，阻止 ASP-1、ASP-2 诱导的凋亡，这表明 ASP-1、ASP-2 能够诱导依赖于 P53 的凋亡。

我们还研究了由于 DNA 损伤而引发的 53BP2 和 I-ASP 对内源 P53 介导的凋亡的显著抑制作用。在加入顺铂（或顺氯氨铂，一种抗癌药）之前，U2OS 和 MCF7 细胞用编码 HPV16E6、I-ASP 或 53BP2 的质粒转染。由于顺铂的作用而发生程序性死亡的细胞所占的百分数用荧光激活细胞分类术测定（图 12B）。用顺铂处理可使 20% 的转染细胞发生程序性死亡。E6 的表达使程序性死亡的细胞所占的百分数降至 15% 以下。这表明 U2OS 细胞中顺铂诱导 p53 依赖性的凋亡。与之类似 I-ASP 或 53BP2 的表达可以阻止顺铂诱导的细胞死亡到与 E6 相似的程度。这些结果表明：内源性 p53 的凋亡功能可以被 ASP 家族成员的高表达水平所调控。

为了进一步证明 ASP 家族成员在调控 P53 介导的凋亡中所起的显著作用，我们采用了反义抑制的方法。我们克隆了 ASP-1、ASP-2、I-ASP cDNA 的 5' 端片段，并且以反义方向克隆到乳腺表达载体中以测定反义 RNA 在 ASP 家族成员体内蛋白质合成中所起的显著作用。反义 ASP-1 的表达仅仅抑制 ASP-1 介导的凋亡，并不影响 ASP-2 介导的凋亡。相似的情况也发生在反义的 ASP-2 中。在相同的条件下，反义 ASP-1、ASP-2 的共表达并不能影响 Bax 介导的凋亡进一步说明了反义 ASP-1、ASP-2 的特殊作用。因此，我们又研究了在 DNA 损伤时内源 ASP-1、ASP-2 对

内源 P53 介导的凋亡功能的调控。在加入顺铂之前，U2OS 和 MCF-7 细胞用各种不同的表达质粒转染。荧光激活细胞分类术表明：20%-30%的对照转染细胞耐受顺铂的作用。E6 的表达使程序性死亡的细胞百分数减少到一半，表明在这些细胞中顺铂能够通过依赖和不依赖 P53 的途径诱导凋亡。反义 RNA ASP-1 或 ASP-2 的表达可以抑制顺铂介导的凋亡到 E6 那样的程度，与 53BP2 和 I-ASP 类似。这表明：回应 DNA 损伤，内源的 ASP-1、ASP-2 在调控 P53 介导的凋亡功能中起着重要的作用。

我们猜想由于顺铂的作用，内源 ASP-1、ASP-2 对 P53 介导的凋亡的刺激作用由于这些细胞中 I-ASP 的高水平表达而可能被忽略。因为 I-ASP 的高表达可以阻止 ASP-1、ASP-2 增强 P53 的凋亡功能。为了研究 I-ASP 的抗凋亡作用，我们用反义 I-ASP 转染 U2OS 和 MCF-7 细胞，反义 I-ASP 诱导的 P53 依赖性凋亡被 E6 的共表达所消除。用反义 I-ASP 消除 I-ASP 的抗凋亡功能也可以使 ASP-1、ASP-2 的凋亡功能增强。与反义 ASP-1、ASP-2 不同，反义 I-ASP 的表达并不阻碍顺铂诱导的程序性死亡。程序性死亡细胞增多的现象经常发生。这些结果表明：ASP-1、ASP-2 在体内可以特异地刺激 P53 的凋亡功能。内源的 I-ASP 可以阻碍内源 P53 介导的凋亡，并且还是 ASP 的抑制物。

反义核酸分子从 ASP-1、ASP-2，I-ASP 的 cDNA 获得，并且使用跨越下列核苷酸的引物从各自的质粒克隆中扩增出来。（相对与起始密码子 ATG）：-74-923；-253-839；-37-536 分别对应于 ASP-1、ASP-2，I-ASP。扩增片段用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化。并且连接于 RcDNA3.1/V5-HisTOPO 载体。包含 ASP-1、ASP-2，I-ASP 反义 DNA 的质粒用 QIAGEN 公司的质粒纯化试剂盒纯化。

25 实施例 11

文献报道 P53 和 NF κ B 的 p65RelA 在相应应力时，对调节凋亡起着非常重要的作用。然而对于在体内这两种程序凋亡机制时如何协同作用的还知道的很少。人们也做了一些实验来看在 p53 和 NF κ B 之间是否又相互作用。最初的证据来自最近的实验发现：p53 可以诱导 NF- κ B 的 DNA 结合活性。更重要的是 p65 rel A 的抑制物 I κ B 能够

阻碍 p53 的凋亡功能。然而并不清楚 p53 是如何诱导 p65 的 DNA 结合活性以及 Ikb 是如何阻碍 p53 的的凋亡功能的。

有趣的是，在酵母的杂交分析中人们最近发现：ASP-2 和 I-ASP 能够与 NF- κ B 的一个组成部件 p65 relA 相互作用。I-ASP 能够阻碍 p65 的反式激活功能，尽管不如 Ikb 有效。ASP-2 及 I-ASP 和 rel A p65 的作用区域与 rel A p65 与 p53 的作用区域非常相似。因此在 53 和 p65 relA 与 ASP-2 和 I-ASP 的作用之间可能存在一些竞争作用。因为 ASP 家族成员有时是 P65 和 P65 之间的普通成分，我们推测 ASP 家族成员可能与 p53 和 NF- κ B 的凋亡功能相关。在这种模式下，p53 通过与核 I-ASP 的相互作用诱导 P65DNA 结合活性是之与 DNA 结合。另外，通过结合 p56 和释放 I-ASP，Ikb 可以阻碍 p53 介导的凋亡。细胞核内 I-ASP 浓度的增加可以 p53 相互作用，并且阻止 ASP-2 或 ASP-1 对 p53 的反式激活功能的促进作用。如果这种假说是正确的，我们可以预见在 ASP-2 或 ASP-1 的存在下，Ikb 的表达可以对 p53 介导的凋亡起到非常显著的作用。

表 13B 中的结果与这种假说一致。在 Ikb 表达的细胞中，7.2%的细胞发生凋亡，而仅用载体转染的细胞发生凋亡的仅有 4.6%。Ikb 对于 P53 介导的凋亡的作用也很小，因为 p53 表达的细胞中程序性死亡的百分数为 12%，而 p53 和 Ikb 都表达的细胞中程序性死亡的细胞为 11%。

这可能归因于在 Saos-2 细胞中非常低的 ASP-1 和 ASP-2 的表达水平。与前述结果一致，ASP-2 的共同表达显著地加强了 p53 的凋亡功能。在 p53+ASP2 转染的细胞中，凋亡细胞占 30%。让我们感兴趣的是，在这种情况下，Ikb 的共同表达显示出最重要的影响。Ikb 的共同表达能够使 p53 和 ASP-2 诱导下的凋亡细胞数量从 30%减至 16%。这一结果表明，Ikb 能够通过阻止 ASP-2 激活 p53 的功能来抑制 p53 诱导的凋亡。当 Ikb 与 p53 共同表达时，我们也得到相似的结果。

我们已经说明 ASP-2 可以通过特异性激活 p53 对如 Bax 这样的原凋亡基因的启动子来增强 p53 的凋亡功能。因此，我们还检测了在 ASP2 存在或不存在的条件下，Ikb 对 p53 作用于 Bax 和 mdm2 启动子的反式激活功能的影响，参见图 13C 和 13D。如前所述，ASP-2 和 p53 的共同表达增强了 p53 的反式激活功能大约 8 倍。在同样的情形下，Ikb 的表达并

没有显示任何可以检测的对 Bax 启动子报道基因活性的抑制，这表明在 Saos-2 细胞中，Ikb 不抑制 Bax 启动子的转录活性是非特异性的。50ng 的 Ikb 与 p53 的共同表达仅仅显示对 p53 反式激活功能的很小抑制。然而，当 Ikb, ASP-2 和 p53 被共同表达时，Ikb 能够显著地抑制 ASP-2 介导的 p53 反式激活功能的激活（图 13D）。

我们已经阐明 ASP-1 和 ASP-2 可以特异性激活 p53 对 Bax 启动子的反式激活功能，而对 mdm2 启动子却没有同样的作用。因此，如果 Ikb 的确是通过 ASP-2 特异性地抑制 p53 的反式激活功能，它将不能显示明显的对 mdm2 启动子活性的抑制。在相同的条件下，我们还检测了 Ikb 抑制 p53 对 mdm2 启动子活性的反式激活功能的能力。如图 13D 所示，p53 对 mdm2 启动子的反式激活作用，在 ASP-2 的共同表达的情形下是极小的。尤其重要的是，即使在 ASP-2 存在的情况下，Ikb 也几乎不抑制 p53 对 mdm2 启动子的反式激活功能。此处这些结果是第一次提出 Ikb 可以通过阻止 ASP-1 或 ASP-2 激活 p53 的反式激活功能来抑制 p53 的凋亡功能。

为了进一步地研究与 p53 和 NFkb 途径相关的 ASP 家族的功能，我们还研究了 ASP-2 和 p65 relA 对 p53 的凋亡功能的互作效应。基于图 13A 的工作模型，p65/ASP 互作可以促进 ASP 蛋白进入核内，因此可发生 p53/ASP 互作和核 I-ASP 释放以结合核 p65。p65 的 176-406 残基与 ASP-2 和 I-ASP 发生结合。

作为一个转录因子，p65 可以反式激活很多靶基因。因为 p53 诱导的凋亡要求 p65 的存在，也与 NFkB 增加的 DNA 结合能力有关系，这表明 p65 的 DNA 结合能力可能是与 p53 协作诱导凋亡时是必须的。能够同时与 p53 和 p65 结合将 ASP 家族蛋白置于一个中心角色。一个可能是 ASP 结合 p65 可能介导了 p53 诱导的 p65 的 DNA 结合能力。然而，p53 的共同表达不能够诱导 p65 对其报道基因的转录活性。p53 和 ASP-2 的共同表达也没有显示对 p65 的反式激活功能的任何显著的作用。这一结果表明 ASP 不是传递 p53 到 p65 的信号的报道基因。虽然如此，ASP 能够使得 p65 协同 p53 诱导凋亡。我们检测了 ASP 的活动是否需要 p65NFkB 的 DNA 结合能力。移去 p65N 末端包括 DNA 结合区域的 100 个氨基酸。当

检测 NF κ B 报道基因质粒时，由此产生的该 Δ p65 构建体没有转录活性。如果该 ASP-p65 互作是 p53 和 NF κ B 路径的介质， Δ p65 对 p53 的凋亡功能的影响将与全长的 p65 相似。否则 Δ p65 将是没有活性的，因为它不能反式激活它的任何靶基因（图 14A）。图 14B 所示结果表明在 ASP-2 存在的情形下，不仅 p65 和 Δ p65 都能激活 p53 的凋亡功能，且 Δ p65 在加强 p53 的凋亡功能上甚至更活跃。这可能归因于 Δ p65 较 p65 更核心（nuclear）。从 Δ p65 获得的数据强有力地表明 p65 可以不依赖于 p65 的 DNA 结合能力而影响 p53 的凋亡功能。因此，ASP-2-p65 互作可以是这一作用的原理。

10

实施例 12

Bcl-2 癌蛋白的抗凋亡功能已经被很好地确立了。有趣的是，Bcl-2 能抑制 p53 诱导的凋亡。而且，Bcl-2 还可以与 ASP-2 互作。然而，对于该互作的生物学结果我们还一无所知。Bcl-2 是如何阻止 p53 诱导的凋亡也还是未知的。采用以上提及的实验系统，我们研究了 Bcl-2 是否是通过阻止 ASP-1 和 ASP-2 激活 p53 来抑制 p53 诱导的凋亡。

新增证据表明 p53 通过转录的依赖和非依赖两条途径来诱导凋亡。我们已经证明，ASP-1 和 ASP-2 通过特异性地加强 DNA 结合和 p53 对如 Bax 和 PIG3 凋亡基因的启动子的反式激活功能，来激活 p53 的凋亡功能。我们还感兴趣于研究 ASP 是否可以非依赖性地加强 p53 的反式激活功能导致的凋亡功能。p53 的一个突变体 p53H175-L，它通过一段前导序列靶向线粒体，并已知可以不依赖于 p53 的反式激活功能诱导凋亡功能。在 Saos-2 细胞中通过表达野生型 p53 或没有转录活性的 p53 和 p53H175-L 可诱导发生凋亡。与以前的报道相一致地，野生型 p53 的凋亡功能通过 ASP-1 和 ASP-2 被激活。然而，ASP-1 和 ASP-2 的共同表达不能够加强 p53H175-L 的凋亡功能。尤其重要的是，只有野生型 p53 诱导的凋亡功能被 Bcl-2 的共同表达所抑制。在同样的条件下，Bcl-2 的共同表达不能抑制 p53H175-L 诱导的凋亡（图 15A）。对 p53 诱导的凋亡的选择性抑制在 Bcl-XL，另一 Bcl-2 家族的凋亡抑制子的共同表达情形下是观察不到的（图 15B）。ASP 对 p53 的凋亡功能的激活能力和 Bcl-2 对 p53 的凋亡

功能的抑制能力之间的联系，表明 Bcl-2 是通过阻止 ASP 激活 p53 来抑制 p53 诱导的凋亡功能。这被图 3C 所示的数据所确证，即 Bcl-2 能够非常有效地阻止 ASP-1 和 ASP-2 加强 p53 的凋亡功能。

5 实施例 13

到目前为止，我们已经知道了 I-ASP 能够在不同的细胞系中抑制 p53 诱导的凋亡，且其表达水平在体内的乳腺癌细胞中被上调。所有这些数据表明 I-ASP 可以成为癌基因。由于 p53 的肿瘤抑制功能被认为与其诱导凋亡的能力最为相关，很有可能 p53 诱导的凋亡功能的抑制可以消除 p53 的肿瘤抑制功能。为了检测 I-ASP 的致癌功能，用表达 I-ASP 的质粒和癌基因，E7 转染大鼠的胚胎成纤维细胞 (REFs)。I-ASP 的表达显著地加强了 E7 的转化功能 (图 16A)。这表明 I-ASP 的确是一个癌基因。

由于绝大多数化疗药物是 DNA 损伤试剂，通过依赖 p53 的路径诱导凋亡功能，我们认为 I-ASP 抑制的凋亡的功能可以使细胞更能够抵抗如顺氯铂胺这样的化疗药物的细胞毒素效应。用表达 I-ASP 的质粒转染 MCF-7 细胞(人的一个乳腺癌细胞系)。比较表达和不表达 I-ASP 的 MCF-7 细胞中的顺氯铂胺细胞毒素的细胞抗性。图 16B 所示结果表明 I-ASP 的表达能够增强细胞抗性约 2.5 倍。这种顺氯铂胺细胞抗性的增加对于癌症治疗在生物学上是非常显著的。因此，I-ASP 的高水平的表达不仅可以解释为什么野生型 p53 在某些人类的肿瘤细胞中是非功能性的。它还可以预测应答治疗的肿瘤。最后，用 I-ASP 超表达细胞可以允许将来对更为有效的化疗药物进行鉴定。

参考文献

25

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S.(1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.

Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T-antigene is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

30

Ludwig,R.T.,Bates,S.,and Vousden,K.H.(1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. Mol.Cell.Biol.16, 4952-4960.

Miyashita,T.,and Reed,J.C.(1995). Tumour suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80, p293-299.

Momand, J., Zambetti,G.P.,Oslon,D.C.,George,D.,and Levine,A.J.(1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 69,1237-1245.

Naumovski,L., and Cleary,M.L.(1996). The p53-binding protein 53BP2 also interacts with bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. Mol.Cell.Biol.16, 3884-3892.

Polyak,K.,Xia,Y.,Zweier,J.L.,Kinzler,K.W.,and Vogelstein, B.(1997). A model for p53-induced apoptosis. Nature 389,300-305.

15

表 1. 表达野生型 p53 的人类乳腺癌样本 (I 级和 II 级) 中的 ASPP 的 mRNA 表达

肿瘤	ASP1	ASP2	I-ASP
1	↓	+	-
2	↓	+	-
3	↓	+	-
4	↓	+	-
5	↓	+	-
6	↓	+	-
7	↓	↓	-
8	+	+	↑
9	↓	↓	-
10	↓	↓	-
11	↓	+	-
12	↓	↓	-
13	↓	↓	-
14	↓	+	-
15	↓	↓	-
16	↓	↓	-
17	+	+	↑
18	↓	+	-
19	↓	+	-
20	+	+	↑
21	+	+	-
22	+	+	-

23	↓	+	-
24	+	+	-
25	+	+	↑
26	+	↓	-
27	↓	↓	-
28	+	+	↑
29	+	+	-
30	↓	+	-
31	+	+	↑
32	+	+	-
33	↓	+	-
34	↓	+	-
35	+	+	-
36	+	+	-
37	+	+	-
38	+	+	↑
39	↓	+	-
40	↓	+	↑

序列表

<110> 路德维希癌症研究院
 <120> 校正基因
 <130> P38080W0
 <140> PCT/GB01/03524
 <141> 2001-08-06
 <150> 0019018.1
 <151> 2000-08-04
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 4834
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 gagccccgca tccccgccga gctgccgcct cgccgcggcc gggccggaga gcacggcggc 60
 gggagcgcgg ccttaggagg cggccggagc ggtgggcaca gctcggcgcg gagcgtcctg 120
 tcaggcggcg gccgaggcg tgcggactc tccccgcgat gatgccgatg atattaactg 180
 ttttcttgag caacaatgaa cagattttaa cagaagtcc tataacaccg gaaacaacct 240
 gtcgagatgt tgtagaattt tgcaaggaac ctggagaagg cagctgcat ttagctgaag 300
 tgtggagggg aatgaacgt cccataacct ttgatcatat gatgtacgaa catcttcaga 360
 tatgggtcc acggagggaa gaagtgaat ttttccttcg acacgaggac tccccaactg 420
 agaacagtga acaaggtggc cgtcagacct aagagcaacg aactcagaga aatgtaataa 480
 atgtacctgg agataaacgt actgaatatg gggttgggta tccacgtgtt gaacttacc 540
 tctcagagct ccaagatatg gcagctaggc aacagcagca gattgaaat cagcagcaga 600
 tgttggttgc caaggaacag cgtttacatt ttctaaagca acaggagcgc cgtcagcagc 660
 agtctatttc tgaaaatgaa aagcttcaga aattgaaaga acgagttgaa gcccaggaga 720
 acaagctgaa gaaaattcgt gcaatgagag gacaagtcca ctacagcaaa atcatgaacg 780
 gcaatctgtc tgctgaaata gaaaggttca gtgccatgtt ccaggaaaag aagcaggaag 840
 tacagactgc aattttaagg gttgatcagc ttagtcagca attggaagat ttaaagaaag 900
 gaaaactgaa tgggttcag tcttacaatg gcaaattgac gggaccagcg gcggtggagt 960
 taaaagact gtaccaagaa ctacagattc gtaaccaact taaccaggaa caaaattcaa 1020
 aactcagca gcagaaggaa ctcttaata agcgcaacat ggaggtggcc atgatggaca 1080
 agcgaatcag tgaactgcgt gaacgtctct atgggaaaaa aattcagctg aaccgtgtga 1140
 atggcacgtc atcaccacag tcccctctga gcacatcggg cagggtcget gctgtggggc 1200
 cttatatcca ggttcccagt gccggaagct ttctgtgct gggggacct ataaagcccc 1260
 agtctctcag tattgctca aatgctgctc atggaagatc caaatccgct aatgatggaa 1320
 actggccaac attaaaacag aattctagct cttccgtgaa accagtcag gtggccgggtg 1380
 cagactgaa ggatccgagc gtggaggggt ctgtcaagca gggcactgtc tccagccagc 1440
 ctgtgccctt ctcagcactg ggaccacagg agaagccggg catcgagatt ggtaaagtgc 1500
 cacctcccat cccgggtgta ggcaagcagc tgcctccaag ctatgggaca tacccaagtc 1560

ctacacctct gggctctggg tcgacaagct ccctggaaag gaggaaggaa ggcagcttgc 1620
ccaggcccag tgcaggcctg ccaagtcgac agaggcccac cctgctgccc gccacaggca 1680
gcacccccca gccaggctcc tcacaacaga ttcagcagag gatttccgta ccgccaagtc 1740
ccacgtacce gccagcggga ccacctgcat ttccagctgg ggacagcaag cctgaactcc 1800
cactgacagt ggcattagg ccttctctgg ctgataaagg gtcaaggcca cagtctccca 1860
ggaaaggacc ccagacagtg aattcaagtt ccatatactc catgtacctc cagcaagcca 1920
caccacctaa gaattaccag ccggcagcac acagcgcctt aaataagtca gttaaagcag 1980
tgtatggtaa gcccgtttta ccttcgggtt caacctctcc atcgccgctg ccgtttcttc 2040
acgggtcact gtccacgggc acaccacagc ctcagccacc ttcagaaagt actgagaaag 2100
agcctgagca ggtaggcccc gcccccccg cagatggcag caccgtggag agcctgccac 2160
ggcactcag cccaccaag ctcacgccc tcgtgcattc gccactgcgc taccagagtg 2220
atgcagacct ggaggccctc cgcaggaagc tggccaacgc gccccggccc ctgaaaaagc 2280
gcagctccat cacagagccc gagggccccg gcgggcccac catccagaag ctgctgtacc 2340
agcgttcaa caccctggcc ggtggcatgg agggcacccc ttctaccag cccagccctt 2400
cccaggactt catgggcacc ttggccgatg tggacaatgg aacaccaat gccaatggaa 2460
acctggaaga gtcccccct gccagcccac cagccccact ccccgtgag cctgccccgt 2520
catcagatgc caatgataat gaggtaactt cccccgaacc agaggagctc atctgtcccc 2580
aaaccacca ccaactgcc gagccggcag aggacaataa caacaacgtg gccacgttcc 2640
ccaccacgga gcagatcccg agtctctgtg ctgaggcccc atctccaggg gaagagcagg 2700
tccctccagc acctcttccc cctgccagcc accctctgc cacctccagc aacaagcggg 2760
ccaacttgaa gaagcccaac tcggagcggg cggggcacgg gctgagagtc cggtttaacc 2820
ccctggcact gtccttagac gcgtctctgg aaggagagtt cgatctggtg cagaggatca 2880
tctatgaggt ggaagatccc agcaagccca acgatgaagg gatcacccca ctgcacaacg 2940
ccgtctgcgc cggccaccat cacatctgta agttctgct ggattttggt gtcaacgtga 3000
atgctgctga tagtgatgga tggacgccgc tgcactgcgc tgctcttgt aacagcgttc 3060
acctctgcaa acagctggtg gagagtggg cgcaccattt tgctcaacc ataagcgaca 3120
ttgaaactgc tgcagacaag tgtgaggaga tggaggaagg ctacatccag tgetcccagt 3180
ttctatatgg ggtgcaggaa aagctgggtg tgatgaacaa aggtgtggcg tatgctctgt 3240
gggactacga ggcccagaac agtgacgagc tgccttcca cgaaggggac gcctcacca 3300
tctgaggcg caaggacgaa agcagactg agtgggtggt ggctgcctt ggagaccggg 3360
aggctatgt gcccaaaaac ctgctggggc tgtatccac gatcaaacc cgacagcgaa 3420
cactgcctg aacttcctt tggagcaccg catggtctt ccagctacca ggagccactt 3480
aagagattat tgtctgttt tccaggaaag ctgcagctag aaaatggtct taatggtgct 3540
cactttagca gacagcgtcc acaatgtgaa tctacagtt tccaggtgag gccctttctc 3600
cagtttgcce attaactggg agaggtactt tcgcctcaa ggactgaatt ttgccaatta 3660
ctataaatcc aaataaatac ccactttcaa aacaccacc cctcttgcca ttaagaagtc 3720
ccataacccc cggttggtt ccagtgaaga cagaagctct tactgacttg gccccaggc 3780

```

catcaccccc tccagcagtg aacactgtcc gccgctgtga ggccctgtcc cctgcgaccg 3840
ccctgcccc cgtcaccgaa tcggacactc atcctttctc acacttccca cacatgatcc 3900
ttcttccctt catcaccaaa ggagcctctg tatggaaaca tgtccagtgt tgetgcccag 3960
tgtgtatgcc tcccagtacc cactctgtct ggccgccttg ggggttccgc ttctgttcc 4020
agttcaccta aaggctgatt gtgcaggccc agcactgtgg ctggactgcc gcgccacggg 4080
caccaggacc cctaagacca agtgacaact gggagagcct cagcatatac tcttctctc 4140
cgatctcaca gctgtcatg ctgctcagtg tggttctcac cctgcaagc tcaaattcag 4200
ttccctgaat ggagtcaggt gctggaggcc gtggcagcgg aggggtgttg gggttggggc 4260
tgggggtgga ctggtgtgag ggcagaccag gccaggtag acggggctgt ttggtgcctg 4320
aaggatggca gacgcctggt gtcaggaggg gccgccacca aggagcagca gctggggcag 4380
aggagctggg gtcaggggcc acccctctct gccgatctcc ctgcctgggc tggctgtgag 4440
gccacctttg tcccaggccc agcctcaagg caaggagggc gcttcaactga ggtgtgaatt 4500
giacgtacag gctttttata taccaaaagt atttttgac tagaccattc aaagctaccc 4560
gaactatggt ggaaattttt ttttttctca ttaaaataca ggcccttagg ctctattttt 4620
catgtatgag tcgtgtgtaa tttatgtaaa aatgtgtgta cagactcact gatgcagcac 4680
thtagcccat caccttggag cactgactgt acatagtgtg gtgaagaaaa gtgaacgccc 4740
ttgtagagca gcccgaccac aggagcatgg ccgctgccag cccagacgct gctgacgctg 4800
tgtaaagtgt cacaataaac ccgtctcacc ccgg 4834

```

```

<210> 2
<211> 4402
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 2
gtcacgagcg tcgaagagac aaagccgct cagggggccc ggccggggcg ggggagcccg 60
gggcttgttg gtgccccagc ccgcgcggag ggcccttcgg acccgcgcg cgccgctgcc 120
gccgccgccc cctcgcaaca ggtccgggcg gcctcgctct ccgctcccct cccccgcatc 180
cgcgaccctc cggggcacct cagctcggcc ggggcccgag tctggccacc cgcttccatg 240
cggttcgggt ccaagatgat gccgatgtt cttaccgtgt atctcagtaa caatgagcag 300
cacttcacag aagttccagt tactccagaa acaatatgca gagacgtggt ggatctgtgc 360
aaagaacccg gcgagagtga ttgccattg gctgaagtgt ggtgtggctc tgaacgtcca 420
gttgccgata atgagcgaat gtttgatgt cttcaacgat ttggaagtca gaggaacgaa 480
gttcgcttct tccttcgta tgaacgccc cctggcaggg acattgtgag tggaccaaga 540
tctcaggatc caagtttaaa aagaatggt gtaaaagttc ctggtgaata tcgaagaaag 600
gagaacggtg ttaatagtc taggatggat ctgactcttg ctgaacttca ggaaatgca 660
tctcgccagc agcaacagat tgaagcccag caacaattgc tggcaactaa ggaacagcgc 720
ttaaagtttt tgaacaaca agatcagcga caacagcaac aagttgctga gcaggagaaa 780
cttaaaggc taaagaaat agctgagaat caggaagcta agctaaaaaa agtgagagca 840
cttaaaggcc acgtggaaca gaagagacta agcaatggga aacttgtgga ggaaattgaa 900
cagatgaata atttgttcca gcaaaaacag agggagctcg tcctggctgt gtcaaaagta 960

```

gaagaactga ccaggcagct agagatgctc aagaacggca ggatcgacag ccacatgac	1020
aatcagtctg cagtggtgta gcttgatcgc ctctataagg agctgcagct aagaacaaa	1080
ttgaatcaag agcagaatgc caagctacaa caacagaggg agtgttttaa taagcgtaat	1140
tcagaagtgg cagtcatgga taagcgtggt aatgagctga gggaccggct gtggaagaag	1200
aaggcagctc tacagcaaaa agaaaatcta ccagtttcat ctgatggaaa tcttccccag	1260
caagccgctc cagccccaag ccgtgtggct gcagtaggtc cctatatcca gtcattact	1320
atgcctcgga tgccctcaag gcctgaattg ctggtgaagc cagccctgcc ggatggttcc	1380
ttggcattc aggttcaga gggccgatg aaaatacaga cactgcccac catgagatct	1440
gggctgctt cacaaactaa aggtctaaa atccatccag ttggccctga ttggagtctt	1500
tcaaatgcag atcttttccc aagccaaggc tctgcttctg tacctcaaag cactgggaat	1560
gctctggatc aagttgatga tggagaggtt ccgctgaggg agaaagagaa gaaagtgcgt	1620
ccgttctcaa tgtttgatgc agtagaccag tccaatgccc caccttctt ttgtactctg	1680
aggaagaacc agagcagtg agatattctg cgggatgctc aggttgcaaa taaaatgtg	1740
gctaaagtac cacctcctgt tctacaaaa ccaaacaga ttaatttgc ttattttgga	1800
caactaatc agccacctc agacattaag ccagacggaa gttctcagca gttgtcaaca	1860
gttgttccgt ccattgggaa taaacaaaa ccagcagggc agcagccgag agtgctgcta	1920
tctcccagca taccttgggt tggccaagac cagacctt ctccaggtc taagcaagaa	1980
agtccacctg ctgctgccgt ccggccctt actccccagc ctccaaga caccttactt	2040
ccaccttca gaaacccca gaccgtgca gcaagttcaa tatattccat gtatagcaa	2100
cagcagggc caggaaaaa cttccagcag gctgtgcaga gcgcttgac caagactcat	2160
accagagggc cacactttc aagtgtatat ggtaagcctg taattgtctg tgcccagaat	2220
caacagcagc acccagagaa cattattcc aatagccagg gcaagcctgg cagtccagaa	2280
cctgaacag agcctgttcc ttcagttcag gagaacctg aaaacgaaag aattcctcgg	2340
ccactcagcc caactaaatt actgccttc ttatctaate ctaccgaaa ccagagtgat	2400
gctgacctag aagccttacg aaagaaactg tctaacgcac caagcctct aaagaaactg	2460
agttctatta cagagccaga gggcctaat gggccaaata ttcagaagct tttatatcag	2520
aggaccacca tagcggccat ggagaccatc tctgtccat cataccatc caagtcagct	2580
tctgtgactg ccagctcaga aagccagta gaaatccaga atccatattt acatgtggag	2640
cccgaaaagg aggtgtctc tctggttctt gaatcattgt ccccagagga tgtggggaat	2700
gccagtacag agaacagtga catgccagct ccttctccag gccttgatta tgacctgag	2760
ggagtcccag acaacagccc aatctccag aataaccag aagaacaaa tccagaggct	2820
ccacatgtgc ttgatgtgta cctggaggag taccctccat acccaccacc accataccca	2880
tctggggagc ctgaagggcc cggagaagac tcggtgagca tgcgcccgc tgaatcacc	2940
gggcaggtct ctctgcctcc tggtaaaagg acaaacttgc gtaaaactgg ctgagagct	3000
atcgctcatg gaatgagggt gaaattcaac ccccttctt tactgctaga ttctctttg	3060
gagggagaat ttgacctgt acagagaatt atttatgagg ttgatgacc aagcctgccc	3120
aatgatgaag gcatcacggc tctcacaat gctgtgtgtg caggccacac agaaatcgtt	3180
aagttcctgg tacagtttgg tgtaaatgta aatgctgctg atagtgatgg atggactcca	3240

ttacattgtg ctgcctcatg taacaacgtc caagtgtgta agtttttggg ggagtcagga 3300
 gccgctgtgt ttgccatgac ctacagtac atgcagactg ctgcagataa gtgcgaggaa 3360
 atggaggaag gctacactca gtgctccaa tttctttatg gagttcagga gaagatgggc 3420
 ataatgaata aaggagtcac ttatgcgctt tgggattatg aacctcagaa tgatgatgag 3480
 ctgccatga aagaaggaga ctgcatgaca atcatccaca gggaagacga agatgaaatc 3540
 gaatgggtgt gggcgcgcct taatgataag gagggatatg ttccacgtaa cttgctggga 3600
 ctgtacccaa gaattaaacc aagacaaagg agcttggcct gaaacttcca cacagaattt 3660
 tagtcaatga agaattaatc tctgttaaga agaagtaata cgattatfff tggcaaaaat 3720
 ttcacaagac ttattttaat gacaatgtag cttgaaagcg atgaagaatg tctctagaag 3780
 agaatgaagg attgaagaat tcaccattag aggacattta gcgtgatgaa ataaagcatc 3840
 tacgtcagca ggccatactg tgttggggca aagggtgcc gtgtagcact cagataagta 3900
 tacagcgaca atcctgtttt ctacaagaat cctgtctagt aaataggatc atttattggg 3960
 cagttgggaa atcagctctc tgcctgttg agtgttttca gcagctgctc ctaaaccagt 4020
 cctcctgcca gaaaggacca gtgccgtcac atcgtgtct ctgattgtcc cggcaccag 4080
 caggccttgg ggctcactga aggctcgaag gcaactgaca ccttgtatat tgcagtgaa 4140
 gaacgttagt tggttgtcag tgaacaataa ctttattata tgagttttg tagcatctta 4200
 agaattatac atatgtttga aatattgaaa ctaagctaca gtaccagtaa ttagatgtag 4260
 aatcttgttt gtaggctgaa ttttaactctg tatttattgt cttttgtatc tcagaaatta 4320
 gaaacttgc acagacttac ccgtaatatt tgtcaagatc atagctgact ttaaaaacag 4380
 ttgtaataaa cttttgatg ct 4402

<210> 3
 <211> 2156
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gcggccgctg cgaccggcg ttcagacgcg ggcagctacc ggcgctcgt gggctccgcg 60
 gggccgctcg gcactttgcc tcgcagctgg cagcccgtca gccgcatccc catgcccc 120
 tccagcccc agccccgcg ggcgccgccc cagcgtccca tccccctcag catgatcttc 180
 aagctgcaga acgccttctg ggagcacggg gccagccgcg ccatgctccc tgggtcccc 240
 ctcttcaccc gagcaccccc gcctaagctg cagcccaac cacaaccaca gccccagcca 300
 caatcacaac cacagcccca gctgcccaa cagcccaga cccaacccca aaccctacc 360
 ccagcctccc acatcgcac cccaacaga catggcccc tgtgaacgaa ggacccccca 420
 aacccccac cgagctggag cctgagccgg agatagagg gctgctgaca ccagtctgg 480
 aggetggcga tgtggatgaa ggaccctgta gcaaggcctc tcagccccac gaggctgcag 540
 ccagcactgc caccggagge acagtgggtg cccgagctgg aggaggtggc acgggtgttg 600
 gcggaaatc cccggccct caaacgcagg ggetccatgg agcaggcccc tgetgtggcc 660
 ctgcccccta cccacaagaa acagtaccag cagatcatca gccgctctt ccatcgtcat 720
 ggggggcccag gggccgggg gcggagccag agctgtcccc catcactgag ggatctgagg 780
 ccagggcagg gccccctgct cctgccccac cagctccat tccaccgccc gggccccctc 840

```

cagagcagcc caccagagca gccgagagc atggagatgc gctctgtgct gcggaaggcg 900
ggctccccgc gcaaggcccc ccgcgcgcgc ctcaaccctc tgggtctcct cctggacgcg 960
gcgctgaccg gggagctgga ggtggtgcag caggcgggtga aggagatgaa cgacccgagc 1020
cagcccaacg aggagggcat cactgccttg cacaacgcca tctgcggcgc caactactct 1080
atcgtggatt tcctcatcac cgcgggtgcc aatgtcaact cccccacag ccacggctgg 1140
acacccttgc actgcgcggc gtcgtgcaac gacacagtca tctgcatggc gctggtgcag 1200
cacggcgtg caatcttcgc caccacgctc agcgacggcg ccaccgcctt cgagaagtgc 1260
gacccttacc gcgagggtta tgctgactgc gccacctacc tggcagacgt cgagcagagt 1320
atggggctga tgaacagcgg ggcagtgtac gctctctggg actacagcgc cgagttcggg 1380
gacgagctgt ccttccgcga gggcagtcg gtcaccgtgc tgcggaggga cggcccggag 1440
gagaccgact ggtggtgggc cgcgctgcac ggccaggagg gctacgtgcc gcggaactac 1500
ttcgggctgt tccccaggt gaagcctcaa aggagtaaag tctagcagga tagaaggagg 1560
tttctgagc tgacagaaac aagcattcct gccttccctc cagacctctc cctctgtttt 1620
ttgctgcctt tatctgcacc cctcacctg ctggtggtgg tccttgccac cggttctctg 1680
ttctcctgga agtccaggga agaaggaggg ccccagcctt aaatttagta atctgcctta 1740
gccttgggag gtctgggaag ggtggaat cactggggac aggaaaccac ttccttttgc 1800
caaatcagat cccgtccaaa gtgcctccca tgctaccac catcatcaca tccccagca 1860
agccagccac ctgccagcc ggcctggga tggccacca caccactgga tattcctggg 1920
agtcactgct gacaccatct ctcccagcag tcttggggtc tgggtgggaa acattggtct 1980
ctaccaggat cctgccccca cctctcccca attaagtgcc ttcacacagc actggtttaa 2040
tgtttataaa caaatagag aaactggtt aatgtttata aacaaaatag agaaacttc 2100
gcttataaat aaaagtagtt tgcacagaaa tgaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa 2156

```

```

<210> 4
<211> 350
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```
<400> 4
```

```
Met Trp Met Lys Asp Pro Val Ala Arg Pro Leu Ser Pro Thr Arg Leu
1 5 10 15
```

```
Gln Pro Ala Leu Pro Pro Glu Ala Gln Ser Val Pro Glu Leu Glu Glu
20 25 30
```

```
Val Ala Arg Val Leu Ala Glu Ile Pro Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gly
35 40 45
```

```
Ser Met Glu Gln Ala Pro Ala Val Ala Leu Pro Pro Thr His Lys Lys
50 55 60
```

```
Gln Tyr Gln Gln Ile Ile Ser Arg Leu Phe His Arg His Gly Gly Pro
65 70 75 80
```

```
Gly Pro Gly Gly Arg Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ser Leu Arg Asp Leu
85 90 95
```

Arg Pro Gly Gln Gly Pro Leu Leu Leu Pro His Gln Leu Pro Phe His
100 105 110

Arg Pro Ala Pro Ser Gln Ser Ser Pro Pro Glu Gln Pro Gln Ser Met
115 120 125

Glu Met Arg Ser Val Leu Arg Lys Ala Gly Ser Pro Arg Lys Ala Arg
130 135 140

Arg Ala Arg Leu Asn Pro Leu Val Leu Leu Leu Asp Ala Ala Leu Thr
145 150 155 160

Gly Glu Leu Glu Val Val Gln Gln Ala Val Lys Glu Met Asn Asp Pro
165 170 175

Ser Gln Pro Asn Glu Glu Gly Ile Thr Ala Leu His Asn Ala Ile Cys
180 185 190

Gly Ala Asn Tyr Ser Ile Val Asp Phe Leu Ile Thr Ala Gly Ala Asn
195 200 205

Val Asn Ser Pro Asp Ser His Gly Trp Thr Pro Leu His Cys Ala Ala
210 215 220

Ser Cys Asn Asp Thr Val Ile Cys Met Ala Leu Val Gln His Gly Ala
225 230 235 240

Ala Ile Phe Ala Thr Thr Leu Ser Asp Gly Ala Thr Ala Phe Glu Lys
245 250 255

Cys Asp Pro Tyr Arg Glu Gly Tyr Ala Asp Cys Ala Thr Tyr Leu Ala
260 265 270

Asp Val Glu Gln Ser Met Gly Leu Met Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ala
275 280 285

Leu Trp Asp Tyr Ser Ala Glu Phe Gly Asp Glu Leu Ser Phe Arg Glu
290 295 300

Gly Glu Ser Val Thr Val Leu Arg Arg Asp Gly Pro Glu Glu Thr Asp
305 310 315 320

Trp Trp Trp Ala Ala Leu His Gly Gln Glu Gly Tyr Val Pro Arg Asn
325 330 335

Tyr Phe Gly Leu Phe Pro Arg Val Lys Pro Gln Arg Ser Lys
340 345 350

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Arg Leu Gln Pro Ala Leu Pro Pro Glu Ala Gln Ser Val Pro Glu Leu
1 5 10 15

Glu Glu

<210> 6
 <211> 1593
 <212> PRT
 <213> human

<400> 6

Ala Pro His Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ser Pro Arg Pro Gly Arg Arg
 1 5 10 15

Ala Arg Arg Arg Glu Arg Gly Leu Arg Arg Arg Pro Glu Arg Trp Ala
 20 25 30

Gln Leu Gly Ala Glu Arg Pro Val Arg Arg Arg Pro Arg Ala Ser Arg
 35 40 45

Thr Leu Pro Ala Met Met Pro Met Ile Leu Thr Val Phe Leu Ser Asn
 50 55 60

Asn Glu Gln Ile Leu Thr Glu Val Pro Ile Thr Pro Glu Thr Thr Cys
 65 70 75 80

Arg Asp Val Val Glu Phe Cys Lys Glu Pro Gly Glu Gly Ser Cys His
 85 90 95

Leu Ala Glu Val Trp Arg Gly Asn Glu Arg Pro Ile Pro Phe Asp His
 100 105 110

Met Met Tyr Glu His Leu Gln Ile Trp Gly Pro Arg Arg Glu Glu Val
 115 120 125

Lys Phe Phe Leu Arg His Glu Asp Ser Pro Thr Glu Asn Ser Glu Gln
 130 135 140

Gly Gly Arg Gln Thr Gln Glu Gln Arg Thr Gln Arg Asn Val Ile Asn
 145 150 155 160

Val Pro Gly Asp Lys Arg Thr Glu Tyr Gly Val Gly Tyr Pro Arg Val
 165 170 175

Glu Leu Thr Leu Ser Glu Leu Gln Asp Met Ala Ala Arg Gln Gln Gln
 180 185 190

Gln Ile Glu Asn Gln Gln Gln Met Leu Val Ala Lys Glu Gln Arg Leu
 195 200 205

His Phe Leu Lys Gln Gln Glu Arg Arg Gln Gln Gln Ser Ile Ser Glu
 210 215 220

Asn Glu Lys Leu Gln Lys Leu Lys Glu Arg Val Glu Ala Gln Glu Asn
 225 230 235 240

Lys Leu Lys Lys Ile Arg Ala Met Arg Gly Gln Val Asp Tyr Ser Lys
 245 250 255

Ile Met Asn Gly Asn Leu Ser Ala Glu Ile Glu Arg Phe Ser Ala Met
 260 265 270
 Phe Gln Glu Lys Lys Gln Glu Val Gln Thr Ala Ile Leu Arg Val Asp
 275 280 285
 Gln Leu Ser Gln Gln Leu Glu Asp Leu Lys Lys Gly Lys Leu Asn Gly
 290 295 300
 Phe Gln Ser Tyr Asn Gly Lys Leu Thr Gly Pro Ala Ala Val Glu Leu
 305 310 315 320
 Lys Arg Leu Tyr Gln Glu Leu Gln Ile Arg Asn Gln Leu Asn Gln Glu
 325 330 335
 Gln Asn Ser Lys Leu Gln Gln Gln Lys Glu Leu Leu Asn Lys Arg Asn
 340 345 350
 Met Glu Val Ala Met Met Asp Lys Arg Ile Ser Glu Leu Arg Glu Arg
 355 360 365
 Leu Tyr Gly Lys Lys Ile Gln Leu Asn Arg Val Asn Gly Thr Ser Ser
 370 375 380
 Pro Gln Ser Pro Leu Ser Thr Ser Gly Arg Val Ala Ala Val Gly Pro
 385 390 395 400
 Tyr Ile Gln Val Pro Ser Ala Gly Ser Phe Pro Val Leu Gly Asp Pro
 405 410 415
 Ile Lys Pro Gln Ser Leu Ser Ile Ala Ser Asn Ala Ala His Gly Arg
 420 425 430
 Ser Lys Ser Ala Asn Asp Gly Asn Trp Pro Thr Leu Lys Gln Asn Ser
 435 440 445
 Ser Ser Ser Val Lys Pro Val Gln Val Ala Gly Ala Asp Trp Lys Asp
 450 455 460
 Pro Ser Val Glu Gly Ser Val Lys Gln Gly Thr Val Ser Ser Gln Pro
 465 470 475 480
 Val Pro Phe Ser Ala Leu Gly Pro Thr Glu Lys Pro Gly Ile Glu Ile
 485 490 495
 Gly Lys Val Pro Pro Pro Ile Pro Gly Val Gly Lys Gln Leu Pro Pro
 500 505 510
 Ser Tyr Gly Thr Tyr Pro Ser Pro Thr Pro Leu Gly Pro Gly Ser Thr
 515 520 525
 Ser Ser Leu Glu Arg Arg Lys Glu Gly Ser Leu Pro Arg Pro Ser Ala
 530 535 540
 Gly Leu Pro Ser Arg Gln Arg Pro Thr Leu Leu Pro Ala Thr Gly Ser

Pro Ser Pro Glu Pro Glu Glu Leu Ile Cys Pro Gln Thr Thr His Gln
 850 855 860
 Thr Ala Glu Pro Ala Glu Asp Asn Asn Asn Asn Val Ala Thr Val Pro
 865 870 875 880
 Thr Thr Glu Gln Ile Pro Ser Pro Val Ala Glu Ala Pro Ser Pro Gly
 885 890 895
 Glu Glu Gln Val Pro Pro Ala Pro Leu Pro Pro Ala Ser His Pro Pro
 900 905 910
 Ala Thr Ser Thr Asn Lys Arg Thr Asn Leu Lys Lys Pro Asn Ser Glu
 915 920 925
 Arg Thr Gly His Gly Leu Arg Val Arg Phe Asn Pro Leu Ala Leu Leu
 930 935 940
 Leu Asp Ala Ser Leu Glu Gly Glu Phe Asp Leu Val Gln Arg Ile Ile
 945 950 955 960
 Tyr Glu Val Glu Asp Pro Ser Lys Pro Asn Asp Glu Gly Ile Thr Pro
 965 970 975
 Leu His Asn Ala Val Cys Ala Gly His His His Ile Val Lys Phe Leu
 980 985 990
 Leu Asp Phe Gly Val Asn Val Asn Ala Ala Asp Ser Asp Gly Trp Thr
 995 1000 1005
 Pro Leu His Cys Ala Ala Ser Cys Asn Ser Val His Leu Cys Lys
 1010 1015 1020
 Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Ala Ile Phe Ala Ser Thr Ile Ser
 1025 1030 1035
 Asp Ile Glu Thr Ala Ala Asp Lys Cys Glu Glu Met Glu Glu Gly
 1040 1045 1050
 Tyr Ile Gln Cys Ser Gln Phe Leu Tyr Gly Val Gln Glu Lys Leu
 1055 1060 1065
 Gly Val Met Asn Lys Gly Val Ala Tyr Ala Leu Trp Asp Tyr Glu
 1070 1075 1080
 Ala Gln Asn Ser Asp Glu Leu Ser Phe His Glu Gly Asp Ala Leu
 1085 1090 1095
 Thr Ile Leu Arg Arg Lys Asp Glu Ser Glu Thr Glu Trp Trp Trp
 1100 1105 1110
 Ala Arg Leu Gly Asp Arg Glu Gly Tyr Val Pro Lys Asn Leu Leu
 1115 1120 1125
 Gly Leu Tyr Pro Arg Ile Lys Pro Arg Gln Arg Thr Leu Ala Thr
 1130 1135 1140

Ser Phe Trp Ser Thr Ala Trp Ser Cys Gln Leu Pro Gly Ala Thr
 1145 1150 1155
 Glu Ile Ile Val Leu Phe Ser Arg Lys Ala Ala Ala Arg Lys Trp
 1160 1165 1170
 Ser Trp Cys Ser Leu Gln Thr Ala Ser Thr Met Ile Leu Gln Phe
 1175 1180 1185
 Pro Gly Glu Ala Leu Ser Pro Val Cys Pro Leu Thr Gly Arg Gly
 1190 1195 1200
 Thr Phe Ala Ser Lys Asp Ile Leu Pro Ile Thr Ile Asn Pro Asn
 1205 1210 1215
 Lys Tyr Pro Leu Ser Lys His Pro Pro Leu Leu Pro Leu Arg Ser
 1220 1225 1230
 Pro Ile Thr Pro Gly Trp Leu Pro Val Lys Thr Glu Ala Leu Thr
 1235 1240 1245
 Asp Leu Ala Pro Arg Pro Ser Pro Pro Pro Ala Val Asn Thr Val
 1250 1255 1260
 Arg Arg Cys Glu Ala Cys Ser Pro Ala Thr Ala Leu Pro Pro Val
 1265 1270 1275
 Thr Glu Ser Asp Thr His Pro Phe Ser His Phe Pro His Met Ile
 1280 1285 1290
 Leu Leu Pro Phe Ile Thr Lys Gly Ala Ser Val Trp Lys His Val
 1295 1300 1305
 Gln Cys Cys Cys Pro Val Cys Met Pro Pro Ser Thr His Ser Ala
 1310 1315 1320
 Arg Pro Pro Trp Gly Phe Arg Phe Leu Phe Gln Phe Thr Arg Leu
 1325 1330 1335
 Ile Val Gln Ala Gln His Cys Gly Trp Thr Ala Ala Pro Arg Ala
 1340 1345 1350
 Pro Gly Pro Leu Arg Pro Ser Asp Asn Trp Glu Ser Leu Ser Ile
 1355 1360 1365
 Tyr Ser Ser Pro Pro Ile Ser Gln Pro Val Met Leu Leu Ser Val
 1370 1375 1380
 Val Leu Thr Pro Ala Ser Ser Asn Ser Val Pro Met Glu Ser Gly
 1385 1390 1395
 Ala Gly Gly Arg Gly Ser Gly Gly Trp Leu Gly Leu Gly Leu Gly
 1400 1405 1410
 Val Asp Trp Cys Glu Gly Arg Pro Gly Pro Gly Arg Arg Gly Cys
 1415 1420 1425

Leu Val Pro Glu Gly Trp Gln Thr Pro Gly Val Arg Arg Gly Arg
1430 1435 1440

His Gln Gly Ala Ala Ala Gly Ala Glu Glu Leu Gly Ser Gly Ala
1445 1450 1455

Thr Pro Leu Cys Arg Ser Pro Cys Leu Gly Trp Leu Gly His Leu
1460 1465 1470

Cys Pro Arg Pro Ser Leu Lys Ala Arg Arg Ala Leu His Gly Val
1475 1480 1485

Asn Cys Thr Tyr Arg Leu Phe Ile Tyr Gln Lys Tyr Phe Leu Thr
1490 1495 1500

Arg Pro Phe Lys Ala Thr Arg Thr Met Leu Glu Ile Phe Phe Phe
1505 1510 1515

Leu Ile Lys Ile Gln Ala Leu Arg Leu Tyr Phe Ser Cys Met Ser
1520 1525 1530

Arg Val Phe Met Lys Cys Val Tyr Arg Leu Thr Asp Ala Ala Leu
1535 1540 1545

Pro Thr Leu Glu His Leu Tyr Ile Val Trp Arg Lys Val Asn Ala
1550 1555 1560

Leu Val Glu Gln Pro Asp His Arg Ser Met Ala Ala Ala Ser Pro
1565 1570 1575

Asp Ala Ala Asp Ala Val Met Cys Thr Ile Asn Pro Ser His Pro
1580 1585 1590

<210> 7
<211> 1446
<212> PRT
<213> human

<400> 7

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

Arg Gly Ser Pro Gly Leu Val Gly Ala Pro Ala Arg Ala Glu Gly Pro
20 25 30

Ser Asp Pro Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gln Gln Val
35 40 45

Arg Ala Ala Ser Leu Ser Ala Pro Leu Pro Arg Ile Arg Asp Pro Pro
50 55 60

Gly His Leu Ser Ser Ala Gly Ala Ala Val Trp Pro Pro Ala Ser Met
65 70 75 80

Arg Phe Gly Ser Lys Met Met Pro Met Phe Leu Thr Val Tyr Leu Ser
85 90 95

Asn Asn Glu Gln His Phe Thr Glu Val Pro Val Thr Pro Glu Thr Ile
 100 105 110
 Cys Arg Asp Val Val Asp Leu Cys Lys Glu Pro Gly Glu Ser Asp Cys
 115 120 125
 His Leu Ala Glu Val Trp Cys Gly Ser Glu Arg Pro Val Ala Asp Asn
 130 135 140
 Glu Arg Met Phe Asp Val Leu Gln Arg Phe Gly Ser Gln Arg Asn Glu
 145 150 155 160
 Val Arg Phe Phe Leu Arg His Glu Arg Pro Pro Gly Arg Asp Ile Val
 165 170 175
 Ser Gly Pro Arg Ser Gln Asp Pro Ser Leu Lys Arg Asn Gly Val Lys
 180 185 190
 Val Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Lys Glu Asn Gly Val Asn Ser Pro Arg
 195 200 205
 Met Asp Leu Thr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Met Ala Ser Arg Gln Gln
 210 215 220
 Gln Gln Ile Glu Ala Gln Gln Gln Leu Leu Ala Thr Lys Glu Gln Arg
 225 230 235 240
 Leu Lys Phe Leu Lys Gln Gln Asp Gln Arg Gln Gln Gln Val Ala
 245 250 255
 Glu Gln Glu Lys Leu Lys Arg Leu Lys Glu Ile Ala Glu Asn Gln Glu
 260 265 270
 Ala Lys Leu Lys Lys Val Arg Ala Leu Lys Gly His Val Glu Gln Lys
 275 280 285
 Arg Leu Ser Asn Gly Lys Leu Val Glu Glu Ile Glu Gln Met Asn Asn
 290 295 300
 Leu Phe Gln Gln Lys Gln Arg Glu Leu Val Leu Ala Val Ser Lys Val
 305 310 315 320
 Glu Glu Leu Thr Arg Gln Leu Glu Met Leu Lys Asn Gly Arg Ile Asp
 325 330 335
 Ser His His Asp Asn Gln Ser Ala Val Ala Glu Leu Asp Arg Leu Tyr
 340 345 350
 Lys Glu Leu Gln Leu Arg Asn Lys Leu Asn Gln Glu Gln Asn Ala Lys
 355 360 365
 Leu Gln Gln Gln Arg Glu Cys Leu Asn Lys Arg Asn Ser Glu Val Ala
 370 375 380
 Val Met Asp Lys Arg Val Asn Glu Leu Arg Asp Arg Leu Trp Lys Lys

Val Ala Ala Ser Ser Ile Tyr Ser Met Tyr Thr Gln Gln Gln Ala Pro
 690 695 700
 Gly Lys Asn Phe Gln Gln Ala Val Gln Ser Ala Leu Thr Lys Thr His
 705 710 715 720
 Thr Arg Gly Pro His Phe Ser Ser Val Tyr Gly Lys Pro Val Ile Ala
 725 730 735
 Ala Ala Gln Asn Gln Gln Gln His Pro Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Ser
 740 745 750
 Gln Gly Lys Pro Gly Ser Pro Glu Pro Glu Thr Glu Pro Val Ser Ser
 755 760 765
 Val Gln Glu Asn His Glu Asn Glu Arg Ile Pro Arg Pro Leu Ser Pro
 770 775 780
 Thr Lys Leu Leu Pro Phe Leu Ser Asn Pro Tyr Arg Asn Gln Ser Asp
 785 790 795 800
 Ala Asp Leu Glu Ala Leu Arg Lys Lys Leu Ser Asn Ala Pro Arg Pro
 805 810 815
 Leu Lys Lys Arg Ser Ser Ile Thr Glu Pro Glu Gly Pro Asn Gly Pro
 820 825 830
 Asn Ile Gln Lys Leu Leu Tyr Gln Arg Thr Thr Ile Ala Ala Met Glu
 835 840 845
 Thr Ile Ser Val Pro Ser Tyr Pro Ser Lys Ser Ala Ser Val Thr Ala
 850 855 860
 Ser Ser Glu Ser Pro Val Glu Ile Gln Asn Pro Tyr Leu His Val Glu
 865 870 875 880
 Pro Glu Lys Glu Val Val Ser Leu Val Pro Glu Ser Leu Ser Pro Glu
 885 890 895
 Asp Val Gly Asn Ala Ser Thr Glu Asn Ser Asp Met Pro Ala Pro Ser
 900 905 910
 Pro Gly Leu Asp Tyr Glu Pro Glu Gly Val Pro Asp Asn Ser Pro Asn
 915 920 925
 Leu Gln Asn Asn Pro Glu Glu Pro Asn Pro Glu Ala Pro His Val Leu
 930 935 940
 Asp Val Tyr Leu Glu Glu Tyr Pro Pro Tyr Pro Pro Pro Tyr Pro
 945 950 955 960
 Ser Gly Glu Pro Glu Gly Pro Gly Glu Asp Ser Val Ser Met Arg Pro
 965 970 975
 Pro Glu Ile Thr Gly Gln Val Ser Leu Pro Pro Gly Lys Arg Thr Asn
 980 985 990

Cys Val Gly Ala Lys Val Ser Arg Val Ala Leu Arg Val Tyr Ser
 1280 1285 1290
 Asp Asn Pro Val Phe Tyr Lys Asn Pro Val Ile Gly Ser Phe Ile
 1295 1300 1305
 Gly Gln Leu Gly Asn Gln Leu Ser Val Leu Leu Ser Val Phe Ser
 1310 1315 1320
 Ser Cys Ser Thr Ser Pro Pro Ala Arg Lys Asp Gln Cys Arg His
 1325 1330 1335
 Ile Ala Val Ser Asp Cys Pro Arg His Gln Gln Ala Leu Gly Leu
 1340 1345 1350
 Thr Glu Gly Ser Lys Ala Leu His Thr Leu Tyr Ile Val Ser Glu
 1355 1360 1365
 Glu Arg Leu Val Val Ser Glu Gln Leu Tyr Tyr Met Ser Phe Cys
 1370 1375 1380
 Ser Ile Leu Arg Ile Ile His Met Phe Glu Ile Leu Lys Leu Ser
 1385 1390 1395
 Tyr Ser Thr Ser Asn Met Asn Leu Val Cys Arg Leu Asn Phe Asn
 1400 1405 1410
 Leu Tyr Leu Leu Ser Phe Val Ser Gln Lys Leu Glu Thr Cys Tyr
 1415 1420 1425
 Arg Leu Thr Arg Asn Ile Cys Gln Asp His Ser Leu Lys Gln Leu
 1430 1435 1440
 Thr Phe Cys
 1445

GAGCCCCGCATCCCGCCGAGCTGCCGCCCTGCCCGCGGCCGGGCCGGAGAGC
 ACGGCGGGCGGGAGCGCGGCCCTAGGAGGCGGCCGGAGCGGTGGGCACAGCT
 CGGCGCGGAGCGTCCTGTAGGCGGCGGCCGAGGGCGTCCGCGGACTCTCCCC
 GCGATGATCCCGATGATATTAAGTGTCTTCTGAGCAACAATGAACAGATTTT
 AACAGAAGTCTCTATAACACCGGAAACAACCTGTCGAGATGTTGTAGAAATTT
 TGCAAGGAACCTGGAGAAGGCAGCTGCCATTTAGCTGAAGTGTGGAGGGGA
 AATGAACGTCCCATACCCCTTTGATCATATGATGTACGAACATCTTCAGATATG
 GGTCCACGAGGGAAGAAGTGAAATTTTTCTTCGACACGAGGACTCCCCA
 ACTGAGAACAGTGAACAAGGTGGCCGTACAGCCCAAGAGCAACGAACACTCAG
 AGAAATGTAATAAATGTACCTGGAGATAAACGTACTGAATATGGGGTTGGGT
 ATCCACGTGTAGAACTTACCCTCTCAGAGCTCCAAGATATGGCAGCTYAGGCA
 ACAGCAGCAGATTGAAAATCAGCAGCAGATGTTGGTTGCCAAGGAACAGCGT
 TTACATTTTCTAAAGCAACAGGAGCGCCGTACGACGAGTCTATTTCTGAAA
 ATGAAAAGCTTCAGAAATTGAAAGAACGAGTTGAAGCCAGGAGAACAAGC
 TGAAGAAAATTTCGTGCAATGAGAGGACAAGTCGACTACAGCAAAATCATGA
 ACGGCAATCTGTCTGCTGAAATAGAAAGGTTTCAGTGCCATGTTCCAGGAAAA
 GAAGCAGGAAGTACAGACTGCAATTTAAGGGTTGATCAGCTTAGTCAGCAA
 TTGGAAGATTTAAGAAAGGAAAACCTGAATGGGTTCCAGTCTTACAATGGCA
 AATTGACGGGACCAGCGCGGTGGAGTTAAAAGACTGTACCAAGAAGTAC
 AGATTCGTAACCAACTTAACCAGGAACAATTCAAAACCTCAGCAGCAGAA
 GGAACCTCTTAAATAAGCGCAACATGGAGGTGGCCATGATGGACAAGCGAATC
 AGTGAACGTGCGTGAAACGTCTCTATGGGAAAAAATTCAGCTGAACCGTGTGA
 ATGSCACGTCATCACCACAGTCCCCTCTGAGCACATCGGGCAGGGTTCGCTGC
 TGTGGGGCCTTATATCCAGGTTCCAGTGCCTGGAAGCTTTCTGTGCTGGGGG
 ACCCTATAAAGCCCCAGTCTCTCAGTATTCCTCAAATGCTGCTCATGGAAGA
 TCCAAATCCGCTAATGATGGAAACTGGCCAACATTAACAGAAATTCAGCT
 CTCCGTGAAACCAGTGCAGGTGGCCGGTGCAGACTGGAAGGATCCGAGCGT
 GGAGGGTCTGTCAAGCAGGGCACTGTCTCCAGCCAGCCTGTGCCCTTCTCA
 GCACCTGGGACCCACGAGAAGCCGGGCATCGAGATTGGTAAAGTGCCACCTC
 CCATCCCGGGTGTAGGCAAGCAGCTGCCTCCAAGCTATGGGACATACCCAAG
 TCCTACACCTCTGGGTCTGGGTGCAAGCTCCCTGGAAAGGAGGAAGGAA
 GGCAGCTTGCCAGGCCAGTGCAGGCCTGCCAAGTCGACAGAGGGCCACCC
 TGCTGCCCCCAGCAGGCAGCACCACCCAGCCAGGCTCCTCACACAGATTCA
 GCAGAGGATTTCCGTACCGCCAAGTCCCACGTACCAGCCAGCGGGACCACCT
 GCATTTCCAGCTGGGGACAGCAAGCCTGAACTCCCCTGACAGTGGCCATTA
 GGCTTTCTGGCTGATAAAGGGTCAAGGCCACAGTCTCCAGGAAAGGACC
 CCAGACAGTGAATTCAAGTTCATATACTCCATGTACCTCCAGCAAGCCACA
 CCACCTAAGAATTACCAGCCGGCAGCACACAGCGCCTTAATAAGTCAGTTA
 AAGCAGTGTATGGTAAGCCCGTTTTACCTTCGGGTTCAACCTCTCCATCGCCG
 CTGCCGTTTCTTACGGGTCACTGTCCACGGGCACACCACAGCCTCAGCCACC
 TTCAGAAAGTACTGAGAAAGAGCCTGAGCAGGATGGCCCCGCCGCCCGCA
 GATGGCAGCACCGTGGAGAGCCTGCCACGGCCACTCAGCCCCACCAAGCTCA
 CGCCCATCGTGCATTCGCCACTGCGCTACCAGAGTGTGACAGACCTGGAGGC
 CCTCCGCAGGAAGCTGGCCAACCGCCCCCGGCCCTGAAAAGCGCAGCTCC
 ATCACAGAGCCCCAGGGCCCCGGGGGCCAACATCCAGAAGCTGCTGTACC
 AGCGCTTCAACACCTTGCCCGGTGGCATGGAGGGCACCCCTTTCTACCAGCC
 CAGCCCCCTCCAGGACTTCATGGGCACCTTGGCCGATGTGGACAATGGAAAC
 ACCAATGCCAATGGAAACCTGGAAGAGCTCCCCCTGCCAGCCACAGCCC
 CACTCCCCGCTGAGCCTGCCCGTCTCAGATGCCAATGATAATGAGTTACCT
 TCCCCGAACCAGAGGAGCTCATCTGTCCCCAACACCACCACCAACTGCCG
 AGCCGGCAGAGGACAATAACAACACGTGGCCACGGTCCCCACCACGGAGC
 AGATCCCAGTCTGTGGCTGAGGCCCATCTCCAGGGGAAGAGCAGGTCCC
 TCCAGCACCTCTTCCCCTGCCAGCCACCCTCTGCCACCTCCACGAACAAGC
 GGACCAACTTGAAGAAGCCCAACTCGGAGCGGACGGGGCACGGGCTGAGAG
 TCCGGTTTAAACCCCTGGCACTGCTCCTAGACGCGTCTCTGGAAGGAGATTC
 GATCTGGTGCAGAGGATCATCTATGAGGTGGAAGATCCCAGCAAGCCCAACG
 ATGAAGGGATCACCCACTGCACAACGCGTCTGCGCCGGCCACCATCACAT

图 1A

CGTGAAGTTCCTGCTGGATTTTGGTGTCAACGTGAATGCTGCTGATAGTGATG
GATGGACGCCGCTGCACCTGCGCTGCCTCTTGTAACAGCGTTCACCTCTGCAA
CAGCTGGTGGAGAGTGGTGCCGCCATTTTGGCTCAACCATAGCGACATTG
AAACTGCTGCAGACAAGTGTGAGGAGATGGAGGAAGGCTACATCCAGTGCTC
CCAGTTTCTATATGGGGTGCAGGAAAAGCTGGGTGTGATGAACAAAGGTGTG
GCGTATGCTCTGTGGGACTACGAGGCCAGAACAGTGACGAGCTGTCTTCC
ACGAAGGGGACGCCCTCACCATCCTGAGGCGCAAGGACGAAAGCGAGACTG
AGTGGTGGTGGGCTCGCCTTGGAGACCGGGAGGGCTATGTGCCAAAACCT
GCTGGGGCTGTATCCACGGATCAAACCCCGACAGCGAACACTCGCCTGAAC
CCTTTTGGAGCACCGCATGGTCTTGCCAGCTACCAGGAGCCACTTAAGAGAT
TATTGTGCTGTTTTCCAGGAAAGCTGCAGCTAGAAAATGGTCTTAATGGTGT
CACTTTAGCAGACAGCGTCCACAATGTGAATCCTACAGTTTCCAGGTGAGGC
CCTTTCTCCAGTTTGCCTAATACTGGGAGAGGTACTTTCGCCTCCAAGGACT
GAATTTTGCCAATTACTATAAATCCAAATAAATACCCACTTTCAAAACACCCA
CCCCTCTTGCCATTAAGAAGTCCATAACCCCGGTTGGTTGCCAGTGAAGAC
AGAAGCTCTTACTGACTTGGCCCCGAGGCCATCACCCCTCCAGCAGTGAAC
ACTGTCCGCCGCTGTGAGGCCTGCTCCCCTGCGACCGCCCTGCCCCCGTCA
CGAATCGGACACTCATCTTTCTCACACTTCCCACACATGATCCTTCTTCCCTT
CATCACCAAGGAGCCTCTGTATGGAAACATGTCCAGTGTGCTGCCAGTG
TGATGCCTCCCAGTACCCACTCTGCTCGGCCGCTTGGGGGTTCCGCTTCT
GTCCAGTTCACCTAAAGGCTGATTGTGCAGGCCAGCACTGTGGCTGGACT
GCCGCCACCGGGCACCAGGACCCCTAAGACCAAGTGACAACCTGGGAGAGC
CTCAGCATATACTTCTCCTCCGATCTCACAGCCTGTCATGCTGCTCAGTGT
GGTTCTCACCCCTGCAAGCTCAAATTCAGTTCCCTGAATGGAGTCAGGTGCTG
GAGGCCGTGGCAGCGGAGGGTGGTTGGGGTTGGGGCTGGGGGTGGACTGGT
GTGAGGGCAGACCAGGGCCAGGTAGACGGGGCTGTTGGTGCCTGAAGGAT
GGCAGACGCCTGGTGTGAGGAGGGCCGCCACCAAGGAGCAGCAGCTGGGG
CAGAGGAGCTGGGGTCAGGGGCCACCCCTCTCTGCCGATCTCCCTGCCTGGG
CTGGCTGTGAGGCCACCTTGTCCCAGGCCAGCCTCAAGGCAAGGAGGGCG
CTTCACTGAGGTGTGAATTGTACGTACAGGCTTTTTATATACAAAAGTATTT
TTTACTAGACCATTCAAAGCTACCCGAATATGTTGGAATTTTTTTTTTTCT
CATTAAAATACAGGCCCTTAGGCTCTATTTTTCATGTATGAGTCGTGTGAAT
TTATGTAAAATGTGTGTACAGACTCACTGATGCAGCACTGTAGCCCATCACC
TTGGAGCACTGACTGTACATAGTGTGGTGAAGAAAAGTGAACGCCCTGTAG
AGCAGCCCCGACCACAGGAGCATGGCCGCTGCCAGCCCAGACGCTGCTGACGC
TGTGTAATGTGCACAATAAACCCGCTCACCCCG

图 1A-续

GTCACGAGCGTGAAGAGACAAAGCCGCGTCAGGGGGCCCGGGGGGGGG
 GGGAGCCCGGGGCTTGTGGTGCCCGCCAGCCCGCGGGAGGGCCCTTCGGACC
 CGCGCGCCGCGTGCCCGCCGCGCCGCTCGCAACAGGTCGGGGCGGCCTC
 GCTCTCCGCTCCCCTCCCCGCATCCGCGACCCTCCGGGGCACCTCAGCTCGG
 CCGGGGCCGAGTCTGGCCACCCGCTTCCATGCGGTTCCGGTCCAAGATGAT
 GCCGATGTTTCTTACCGTGTATCTCAGTAACAATGAGCAGCACTTCACAGAAG
 TTCCAGTTACTCCAGAAACAATATGCAGAGACGTGGTGGATCTGTGCAAAGA
 ACCCGGCGAGAGTGATTGCCATTTGGCTGAAGTGTGGTGTGGCTCTGAACGT
 CCAGTTGCGGATAATGAGCGAATGTTTGATGTTCTTCAACGATTTGGAAGTCA
 GAGGAACGAAGTTCGCTTCTTCCTTCGTCATGAACGCCCCCTGGCAGGGAC
 ATTGTGAGTGGACCAAGATCTCAGGATCCAAGTTTAAAAAGAAATGGTGTAA
 AAGTTCCTGGTGAATATCGAAGAAAGGAGAACGGTGTAAATAGTCCTAGGAT
 GGATCTGACTCTTGCTGAACTTCAGGAAATGGCATCTCGCCAGCAGCAACAG
 ATTTGAAGCCCAGCAACAATTGCTGGCAACTAAGGAACAGCGCTTAAAGTTTT
 TGAACAACAAGATCAGCGACAACAGCAACAAGTTGCTGAGCAGGAGAAAC
 TTAAGGCTTAAAGAAATAGCTGAGAATCAGGAAGCTAAGCTAAAAAAG
 TGAGAGCACTTAAAGGCCACGTGGAACAGAAGAGACTAAGCAATGGGAAC
 TTGTGGAGGAAATTGAACAGATGAATAATTGTTCCAGCAAAAACAGAGGGA
 GCTCGTCTGGCTGTGTCAAAGTAGAAGAACTGACCAGGCAGCTAGAGATG
 CTCAGAACGGCAGGATCGACAGCCACCATGACAATCAGTCTGCAGTGGCTG
 AGCTTGATCGCCTCTATAAGGAGCTGCAGCTAAGAAACAAATTGAATCAAGA
 GCAGAATGCCAAGCTACAACAACAGAGGGAGTGTGTAATAAGCGTAATTCA
 GAAGTGGCAGTCAATGGATAAGCGTGTAAATGAGCTGAGGGACCGGCTGTGGA
 AGAAGAAGGCAGCTCTACAGCAAAAAGAAAATCTACCAGTTTCTATCTGATGG
 AAATCTTCCCAGCAAGCCGCGTCAGCCCCAAGCCGTGTGGCTGCAGTAGGT
 CCTATATCCAGTCATCTACTATGCCTCGGATGCCCTCAAGGCCGTAATTGCT
 GGTGAAGCCAGCCCTGCCGGATGGTTCCTTGGTCATTCCAGGCTTCAGAGGG
 CCGATGAAAATACAGACACTGCCCAACATGAGATCTGGGGCTGCTTCACAAA
 CTAAGGCTCTAAAATCCATCCAGTTGGCCCTGATTGGAGTCTTCAAATGCA
 GATCTTTCCCAAGCCAAGGCTCTGCTTCTGTACCTCAAAGCACTGGGAATGC
 TCTGGATCAAGTTGATGATGGAGAGGTTCCGCTGAGGGAGAAAGAGAAGAA
 AGTGGTCCGTTCTCAATGTTTGATGCAGTAGACCAGTCCAATGCCCCACCTT
 CCTTTGGTACTCTGAGGAAGAACCAGAGCAGTGAAGATATCTTGCGGGATGC
 TCAGGTTGCAATAAAAATGTGGCTAAAAGTACCACCTCCTGTTCTTACAAA
 CCAAAACAGATTAATTTGCCTTATTTGGACAACTAATCAGCCACCTTCAGA
 CATTAAGCCAGACGGAAGTTCTCAGCAGTTGTCAACAGTTGTCCGTTCCATGG
 GAACTAAACCAAAACCAGCAGGGCAGCAGCCGAGAGTGTGCTATCTCCCA
 GCATACCTTCGGTTGGCCAAGACCAGACCCTTCTCCAGGTTCTAAGCAAGA
 AAGTCCACCTGCTGCTGCCGTCGGCCCTTTACTCCCAGCCTTCCAAGACA
 CCTTACTTCCACCCTTCAGAAAACCCAGACCCTGGCAGCAAGTTCAATATAT
 TCCATGTATACGCAACAGCAGGGCCAGGAAAAAATTCAGCAGGCTGTGC
 AGAGCGCGTTGACCAAGACTCATACCAGAGGGCCACACTTTTCAAGTGTATA
 TGGAAGCCTGTAATTGCTGTGCCAGAATCAACAGCAGCACCAGAGAAC
 ATTTATTCCAATAGCCAGGGCAAGCCTGGCAGTCCAGAACCTGAAACAGAGC
 CTGTTTCTTCAAGTTCAGGAGAACCATGAAAACGAAAGAATTCTCGGCCACT
 CAGCCCAACTAAATTAATGCTTTTCTTATCTAATCCTTACCAGAACAGAGTG
 ATGCTGACCTAGAAGCCTTACGAAAGAACTGTCTAACGCACCAAGGCCTCT
 AAAGAAACGTAGTTCTATTACAGAGCCAGAGGGTCTAATGGGCCAAATATT
 CAGAAGCTTTTATATCAGAGGACCACCATAGCGGCCATGGAGACCATCTCTG
 TCCCATCATACCCATCCAAGTCAGCTTCTGTGACTGCCAGCTCAGAAAGCCCA
 GTAGAAATCCAGAATCCATATTTACATGTGGAGCCCGAAAAGGAGGTGGTCT
 CTCTGGTTCCCTGAATCATTGTCCCCAGAGGATGTGGGGAATGCCAGTACAG
 GAACAGTGACATGCCAGCTCCTTCTCCAGGCCTTGATTATGAGCCTGAGGGA
 GTCCAGACAACAGCCCAATCTCCAGAATAACCCAGAAGAACCAATCCA
 GAGGCTCCACATGTGCTTGATGTGTACCTGGAGGAGTACCCTCCATACCCAC
 CCCACCATACCCATCTGGGGAGCCTGAAGGGCCCCGAGAAGACTCGGTGAG
 CATGCGCCCGCTGAAATCACCGGGCAGGTCTCTCTGCCTCCTGGTAAAAGG

图 1B

ACAAACTTGCCTAAAACCTGGCTCAGAGCGTATCGCTCATGGAATGAGGGTGA
AATTCACCCCTTGCTTTACTGCTAGATTGCTCTTTGGAGGGAGAATTTGAC
CTTGACAGAGAATTATTTATGAGGTTGATGACCCAAGCCTGCCAATGATG
AAGGCATCACGGCTCTTCACAATGCTGTGTGTGCAGGCCACACAGAAATCGT
TAAGTTCCTGGTACAGTTTGGTGTAAATGTAATGCTGCTGATAGTGATGGAT
GGACTCCATTACATTGTGCTGCCTCATGTAACAACGTCCTAAGTGTGTAAGTTT
TTGGTGGAGTCAGGAGCCGCTGTGTTTGCCATGACCTACAGTGACATGCAGA
CTGCTGCAGATAAGTGCAGGAAATGGAGGAAGGCTACACTCAGTGCTCCCA
ATTTCTTTATGGAGTTCAGGAGAAGATGGGCATAATGAATTAAGGAGTCATT
TATGCCCTTTGGGATTATGAACCTCAGAAATGATGATGAGCTGCCCATGAAAG
AAGGAGACTGCATGACAATCATCCACAGGGAAGACGAAGATGAAATCGAAT
GGTGGTGGGCGCCCTTAATGATAAGGAGGGATATGTTCCACGTAACCTTGCT
GGGACTGTACCCAAGAATTAACCAAGACAAGGAGCTTGGCCTGAAACTTC
CACACAGAATTTTAGTCAATGAAGAATTAATCTCTGTAAAGAAGAAGTAATA
CGATTATTTTTGGCAAAAATTCACAAGACTTATTTAATGACAATGTAGCTT
GAAAGCGATGAAGAATGTCTCTAGAAGAGAATGAAGGATTGAAGAATTCAC
CATTAGAGGACATTTAGCGTGATGAAATAAAGCATCTACGTCAGCAGGCCAT
ACTGTGTTGGGGCAAAGGTGTCCCGTGTAGCACTCAGATAAGTATACAGCGA
CAATCCTGTTTTCTACAAGAATCCTGTCTAGTAAATAGGATCATTATTGGGC
AGTTGGGAAATCAGCTCTCTGTCTGTGAGTGTTCAGCAGCTGCTCCTAA
ACCAGTCTCTGCCAGAAAGGACCAGTCCCGTCACATCGCTGTCTGTGATTG
TCCCCGGCACCAGCAGGCCCTTGGGGCTCACTGAAGGCTCGAAGGCACTGCAC
ACCTTGATATATGTCAGTGAAGAACGTTAGTTGGTTGTCAGTGAACAATAACT
TTATTATATGAGTTTTTGTAGCATCTTAAGAATTATACATATGTTTGAATATT
GAAACTAAGCTACAGTACCAGTAATTAGATGTAGAATCTTGTGTAGGCTG
AATTTAATCTGTATTTATGTCTTTTGTATCTCAGAAATTAGAACTTGCTAC
AGACTTACCCGTAATATTTGTCAAGATCATAGCTGACTTTAAAAACAGTTGTA
ATAAATTTTTGATGCT

图 1B-续

APHPAAAAASPRPGRRARRRERGLRRRPERWAQLGAERPVRRRRPRASRTLPAAMPMILT
VFLSNNEQILTEVPITPETTCRDVVEFCKEPGECSCHLAEVWRGNERPIPFDHMMYEHLQI
WGPRREEVKFFLRHEDSPTENSEQGGRTQEQRTOQRNVINVPDGRTEYGVGYPRVELT
LSELQDMAARQQQIENQQMLVAKEQRLHFLKQQRQQQSISENEKLQKLKERVEA
QENKLLKIRAMRGQVDYKIMNGNLSAEIERFSAMFQEKKQEVQTAILRVDQLSQQLED
LKKGKLNQFQSYNGKLTGPAAVELKRLYQELQIRNQLNQEONSKLQQQKELLNKRNME
VAMMDKRISLRERLYGKKIQLNRVNGTSSPQSPLSTSGRVAAVGPYIQVPSAGSFPVLG
DPIKPQSLSIASNAAHGRSKSANDGNWPTLKQNSSSSVKPVQVAGADWKDPSVEGSVKQ
GTVSSQVPFSAALGPTEKPGIEIGKVPPIPGVVKQLPPSYGTYPSTPLGPGSTSSLERRKE
GSLPRPSAGLPSRQRPTLLPATGSTPQPGSSQQIQRISVPPSPTYPPAGPPAFPAGDSKPEL
PLTVAIRPFLADKGSRPQSPRKGPTVNSSSIYSMYLQQAATPPKNYQPAAHSA LNKS VKA
VYGKPVLPSTSPSPPLFLHGSLSGTGPQPQPPSESTEKEPEQDGPAAAPADGSTVESLPRP
LSPTKLTPIVHSPRLRYQSDADLEALRRKLANAPRPLKRRSSITEPEGPGGPNIQKLLYQRF
NTLAGGMEGTFFYQSPSQDFMGTADVDNGNTNANGNLEELPPAQPTAPLPAEPAPSS
DANDNELPSPEPEELICPQTTHQTAEPADNNNNVATVPTTEQIPSPVAEAPSPGEEQVPP
APLPPASHPPATSTNKRTNLKKNINSERTGHGLRVRFNPLALLLDASLEGEFDLVQRIIYEV
EDPSKPNDEGITPLHNAV CAGHHHIVKFLDFGVNVNAADSDGWTPHCAASCNSVHLC
KQLVESGAAIFASTISDIETAADKCEEMEEGYIQCSQFLYGVQEKLGVMNKGVAAYALWD
YEAQNSDELSFHEGDALTILRRKDESETEWWWARLGDREGYVPKNLLGLYPRIKPRQRT
LA*TSFWSTAWSCQLPGAT*EIIVLF SRKAAARKWS*WCSL*QTASTM*ILQFPGEALSPV
CPLTGRGTFAASKD*ILPITINPNKYPLSKHPPLPLRSPITPGWLPVKTEALTDLAPRPSPPP
AVNTVRRCEACSPATALPPVTESDTHPFSHFPHMILLPFITKGASVWKHVQCCCPVCMPP
STHSARPPWGFRFLFQFT*RLIVQAQHCGWTAAPRAPGPLRPSDNWESLSIYSSPPISQPV
MLLSVVLTPASSNSVP*MESGAGGRGSGGWLGLGLGVDWCEGRPGPGRRGCLVPEGW
QTPGVRRGRHQGAAAGAEELGSGATPLCRSPCLGWL*GHLCPRPSLKARRALH*GVNCT
YRLFYQKYFLTRPFKATRMTLEIFFFLIKIQA LRLYFSCMSRV*FM*KCVYRLTDAAL*P
TLEH*LYTVW*RKVNALVEQPDHRSMAAASPDAADAV*MCTINPSHP

图 1C

VTSVEETKPRQGARPGRGSPGLVGAPARAEGPSDPRAAAAAAASQQVRAASLSAPLPR
 IRDPPGHLSSAGAAVWPPASMRFGSKMMPMFLTVYLSNNEQHFTEVPVTPETICRDVVD
 LCKEPGESDCHLAEVWCGSERPVADNERMFDVLRQFGSQRNEVRFFLRHERPPGRDIVS
 GPRSQDPSLKRNGVKVPGEYRRKENGVN SPRMDLTLAELQEMASRQQQIEAQQQLLA
 TKEQRLKFLKQQDQRQQQVAEQEKLKRLKEIAENQEAKLKKVRALKGHVEQKRLSNG
 KLVEEIEQMNNLFQQKQRELVLAVSKVEELTRQLEMLKNGRIDSHHDNQS AVAELDRL
 YKELQLRNKLNQEQNAKLQQQRECLNKRNSEVA VMDKRVNELRDRLWKKKAALQOK
 ENLPVSSDGNLPQQAASAPSRVAAVGPYIQSSTMPRMPSRPELLVKPALPDGSLVIQASE
 GPMKIQTLPNMRS GAASQTKGSKJHPVGPDWSPSNADLFPSQGSASVPQSTGNALDQVD
 DGEVPLREKEKKVRPFMFDVAVDQSNAPPSFGTLRKNQSSDILRDAQVANKNVAKVPP
 PVPTKPKQINLPYFGQTNQPPSDIKPDGSSQQLSTVVP SMGTGPKPAGQQPRVLLSPSIPSV
 GQDQTLSPGSKQESPPAAA VRPFTPOPSKDTLLPPFRKPQTVAAASSIYSMYTQQQAPGKN
 FQQA VQSALTKTHTRGPHFSSVYGKPVIAAAQNQQQHPENIYSNSQGKPGSPEPETE PVS
 SVQENHENERIPRPLSPTKLLPFLSNPYRNQSDADLEALRKKLSNAPRPLKKRSSITEPEGP
 NGPNIQKLLYQRTTIAAMETISVPSYPSKSASVTASSESPVEIQNPYLHVEPEKEVVSLVPE
 SLSPEDVGNASTENS DMPAPSPGLDYEPEGVDPNSPNLQNNPEEPNPEAPHVLDVYLEEY
 PYPYPPYPSGEPEGPGEDSVSMRPPETGQVSLPPGKRTNLRKTGSERIAHGMRVKFNPL
 ALLDSSLEGEFDLVQRITYEVD DPSLPNDEGITALHNAVCAGHT EIVKFLVQFGVNVNA
 ADSDGWTP LHCAASCNNVQVCKFLVESGA AVFAMTYSDMQTAADKCEEME EGYTQCS
 QFLYGVQEKMGIMNKGVYIALWDYEPQNDDELPMKEGDCMTI HREDEDEIEWWWAR
 LNDKEGYVPRNLLGLYPRIKPRQRSLA*NFHTEF*SMKN*SLLRRSNTIIFGKNFTRLILMT
 M*LESDEECL*KRMKD*RIHH*RTFSVMK*SIYVSRPYCVGAKVSRVALR*VYSDNPV FY
 KNPV**IGSFIGQLGNQLSVLLSVFSSCS*TSPPARKDQCRHIAVSDCPRHQALGLTEGSK
 ALHTLYIVSEER*LVVSEQ*LYYMSFCSILRIJHMFEILKLSYSTSN*M*NLVCR LNFNLYLL
 SFVSQKLETCYRLTRNICQDHS*L*KQL**TF*C

图 1D

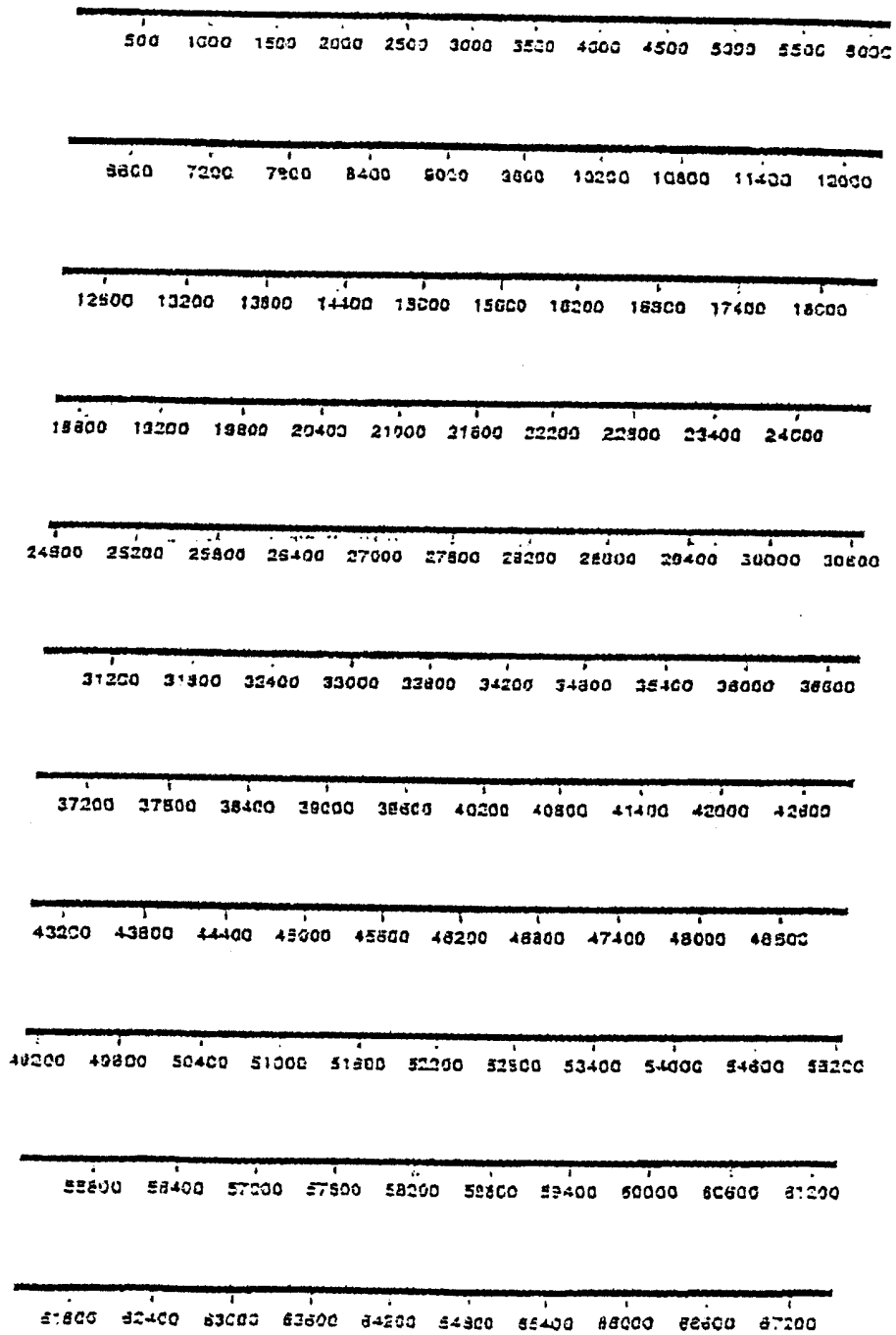


图 1E-1

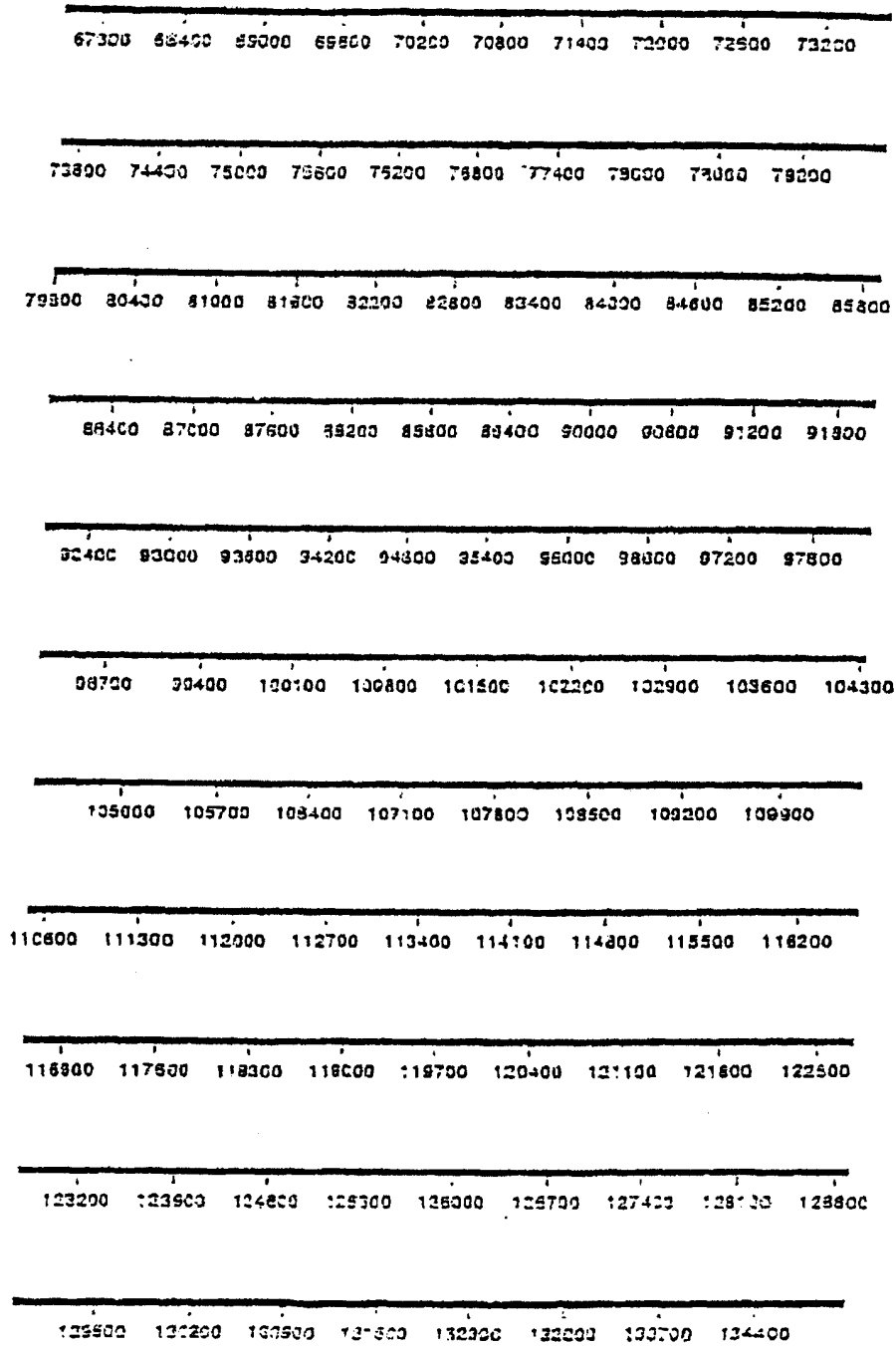


图 1E-2

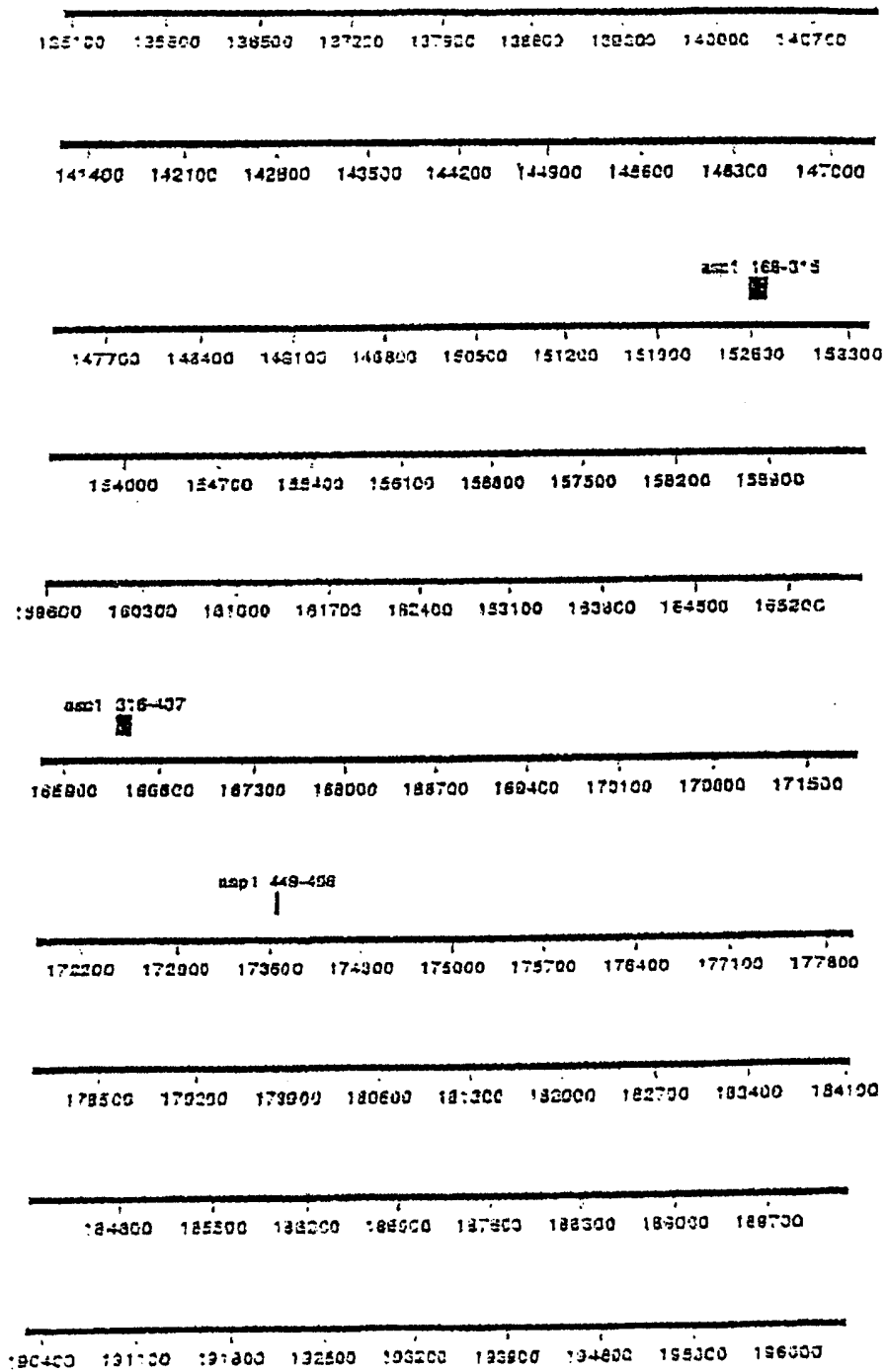


图 1E-3

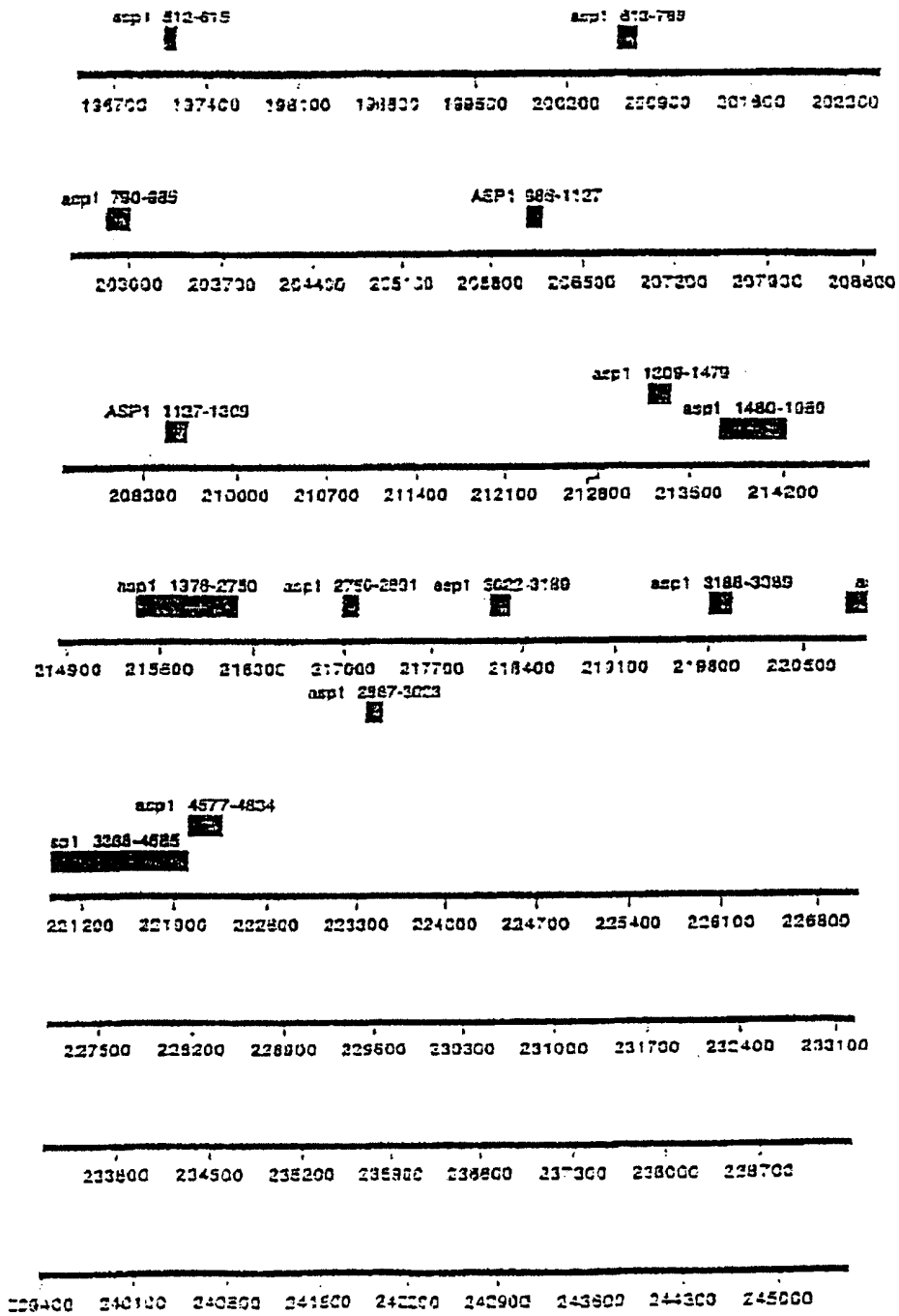


图 1 E-4

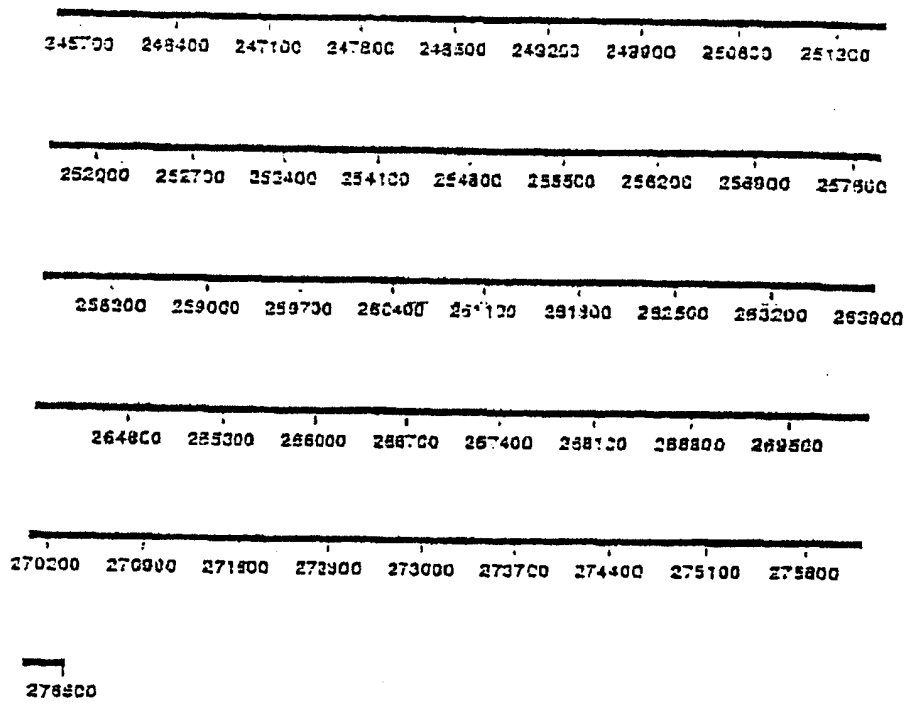


图 1 E-5

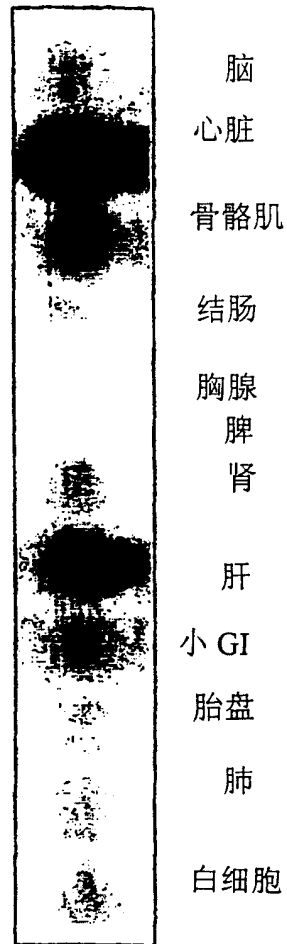


图 2A

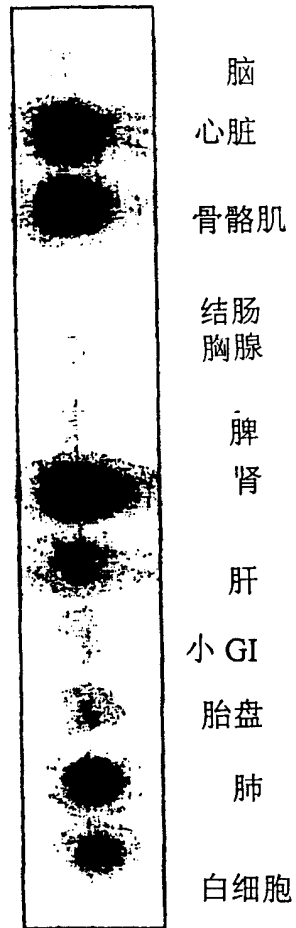


图 2B

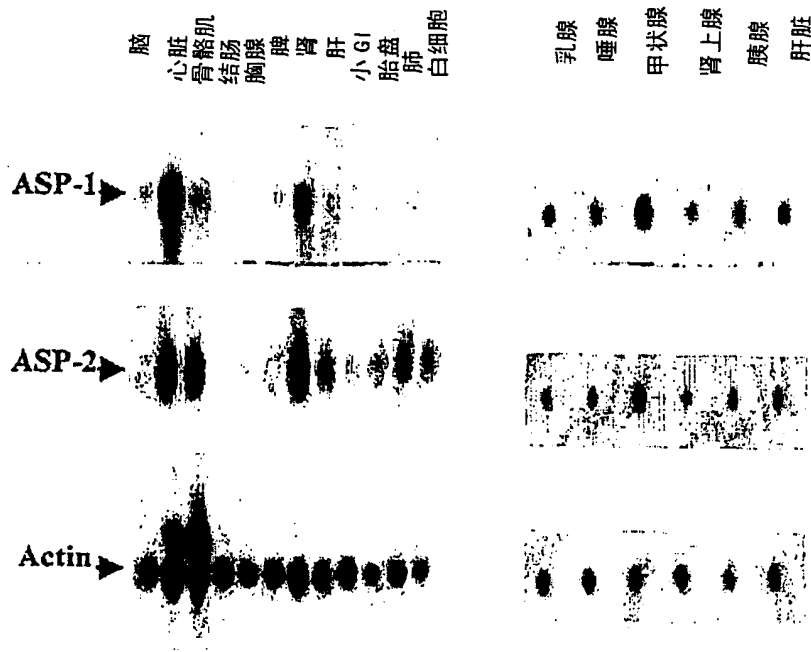


图 2C

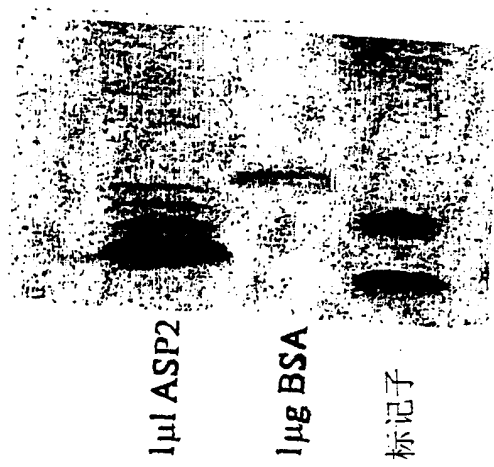


图 3A

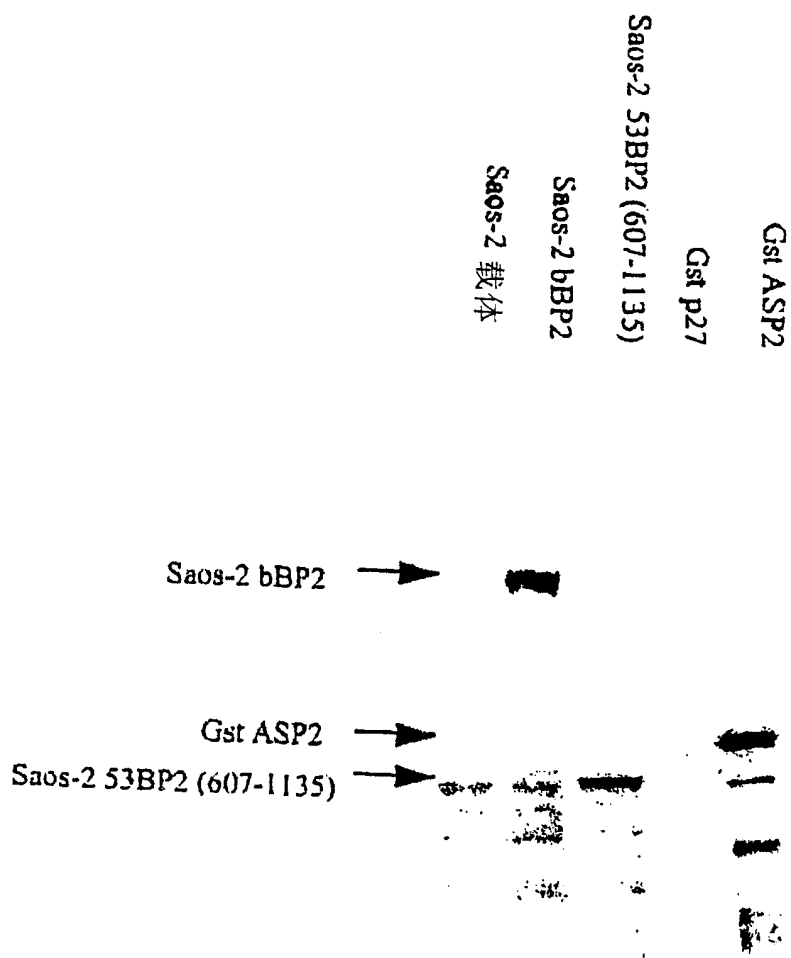


图 3B

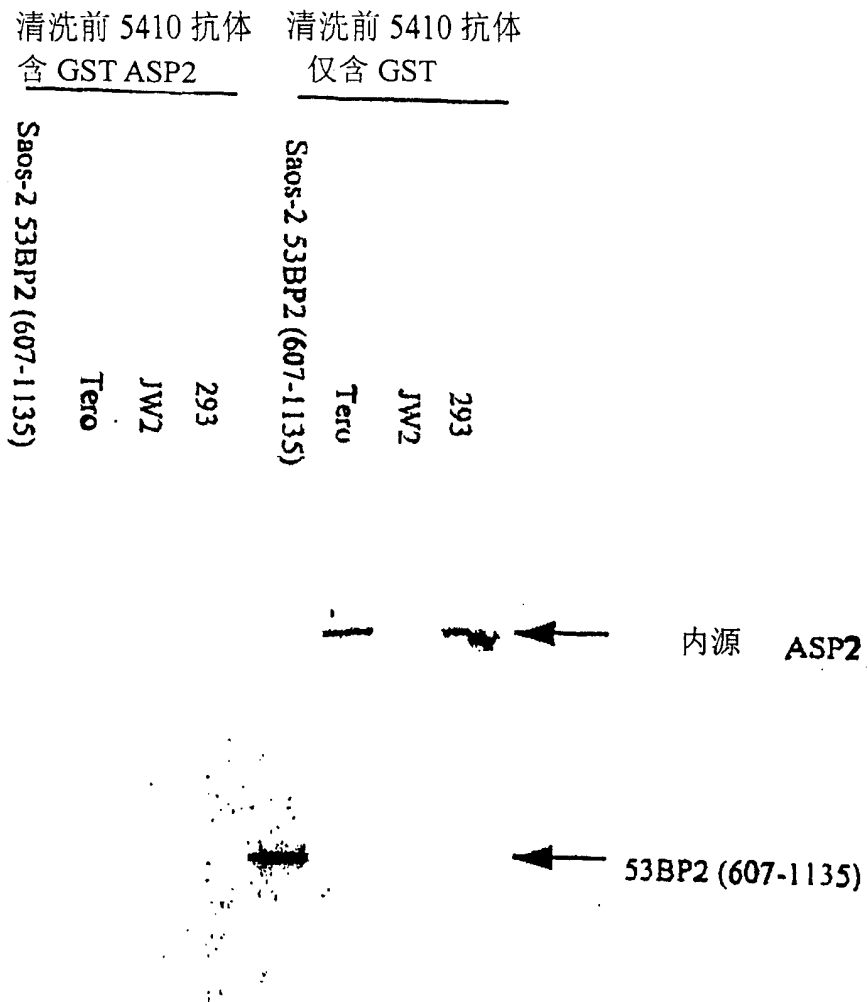


图 3C

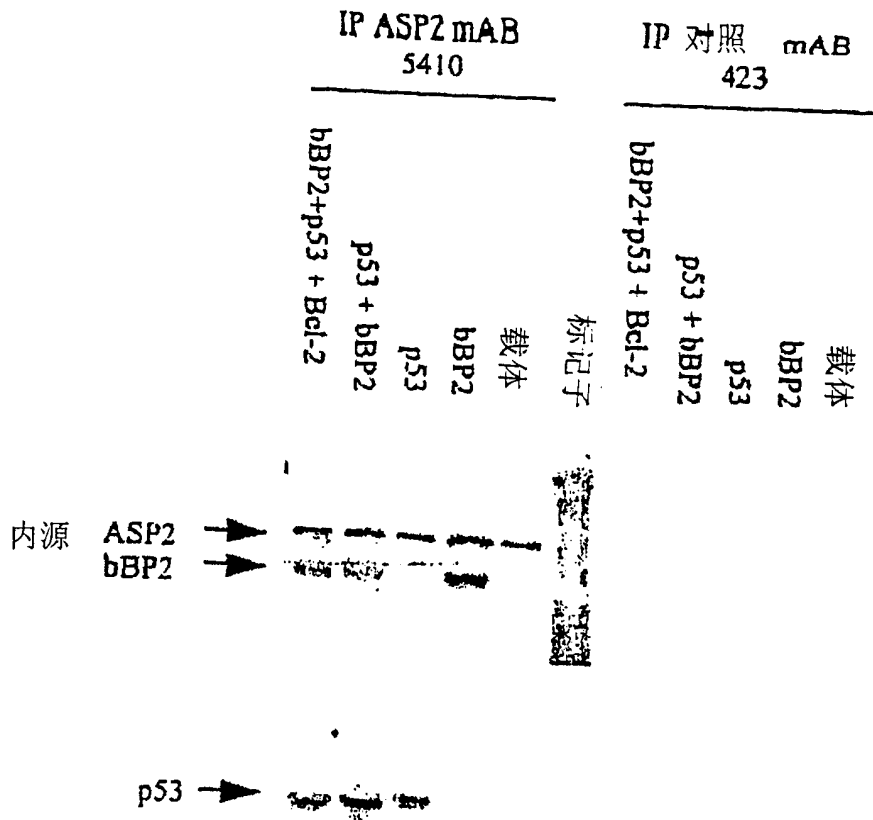


图 4A

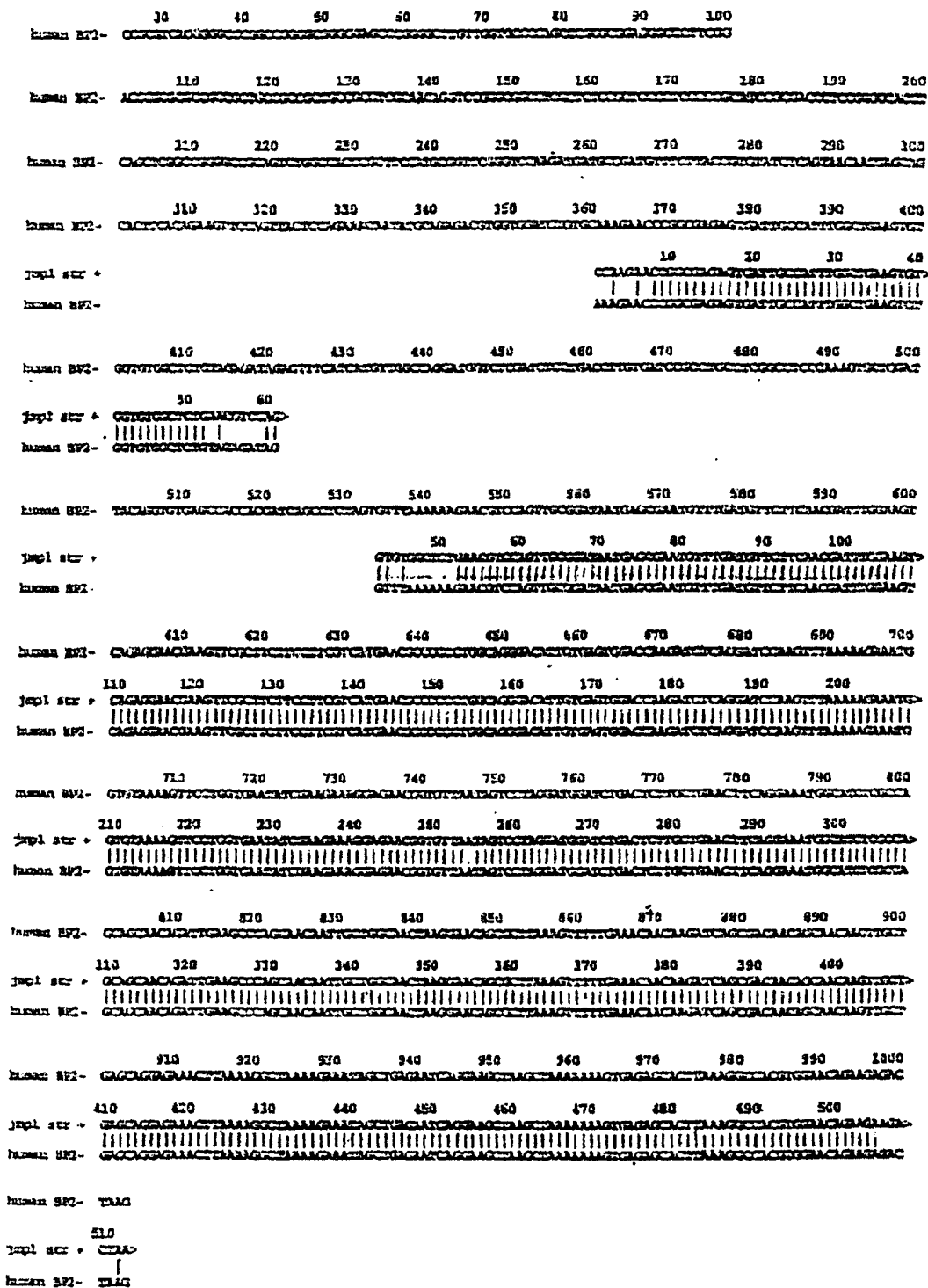


图 4B

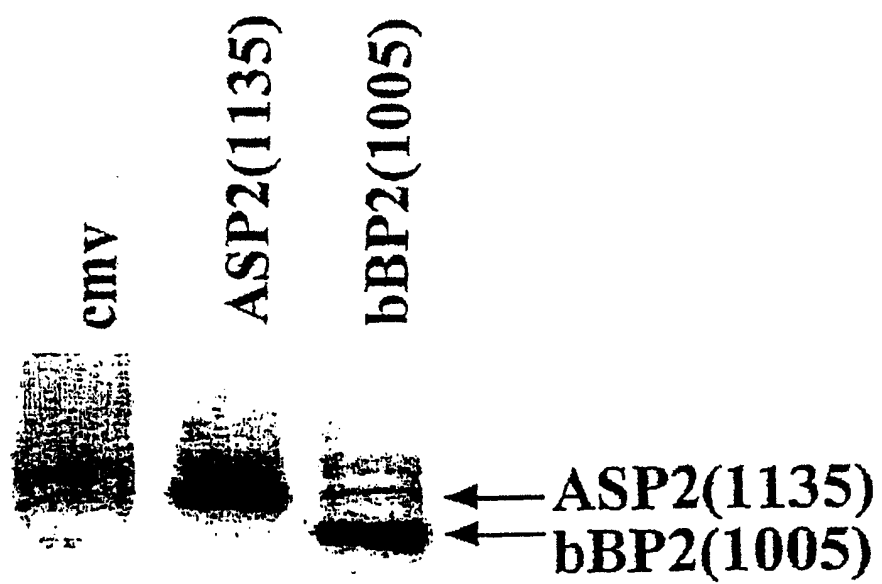


图 4C

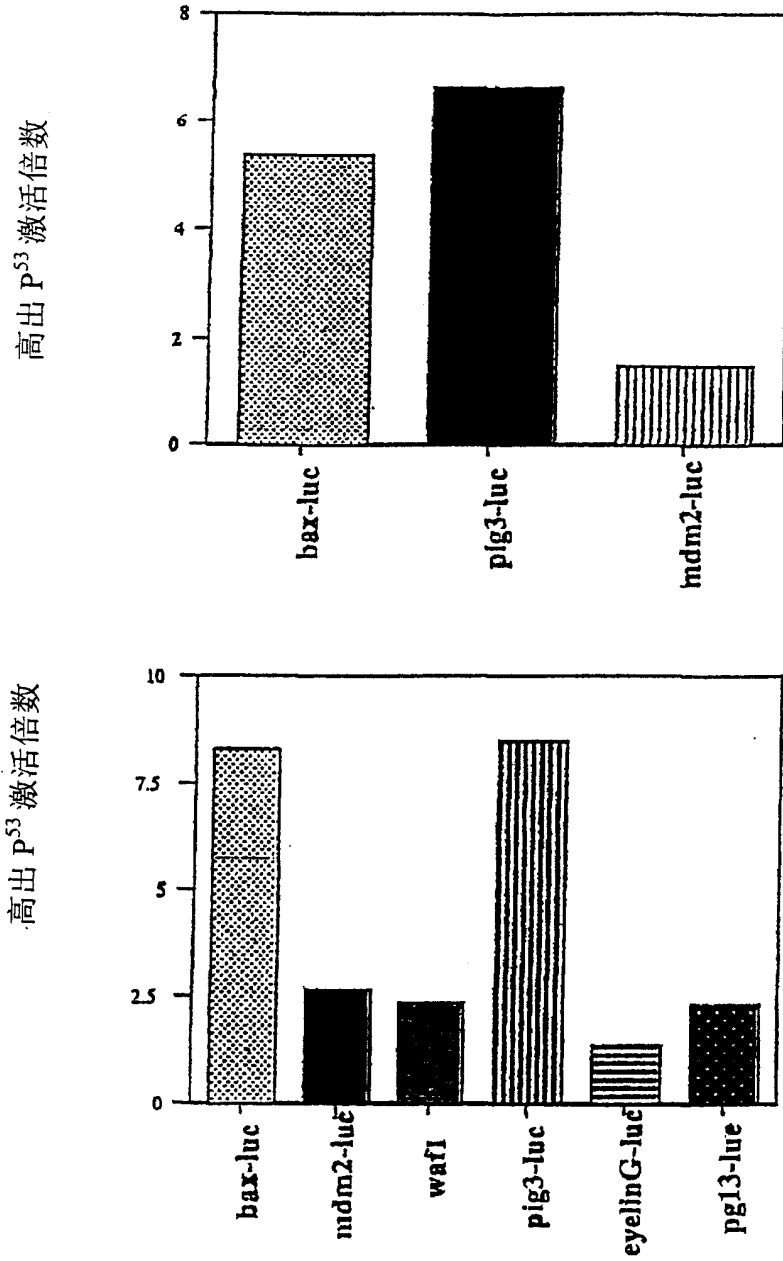


图 5A

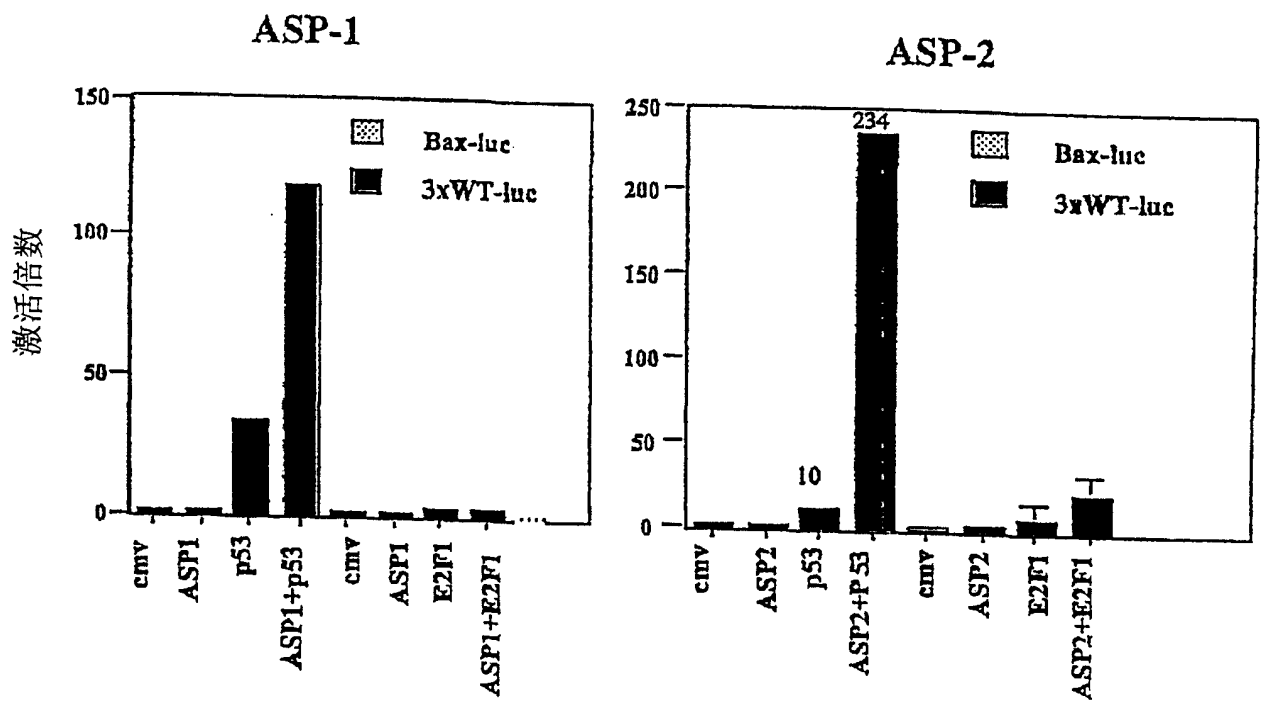


图 5B

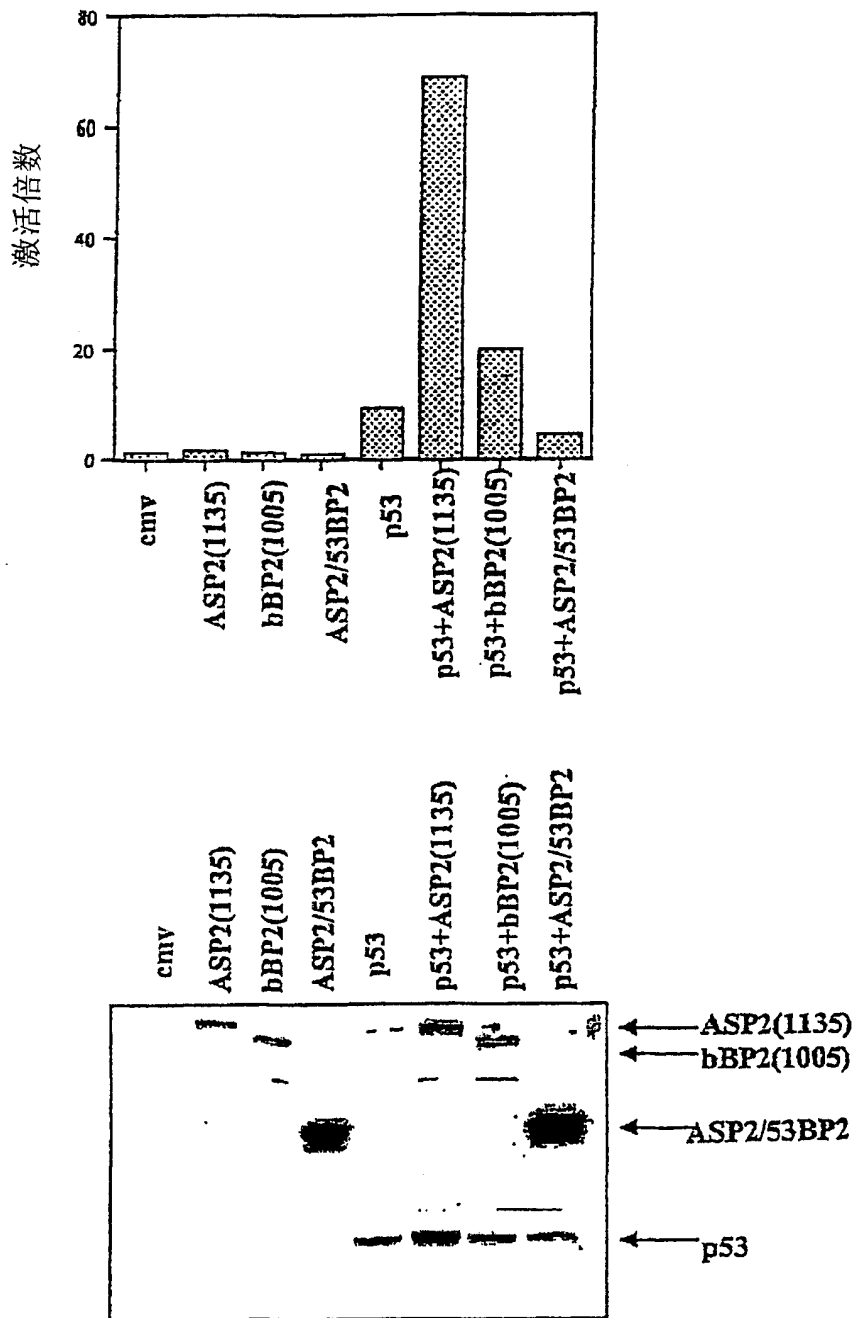


图 6

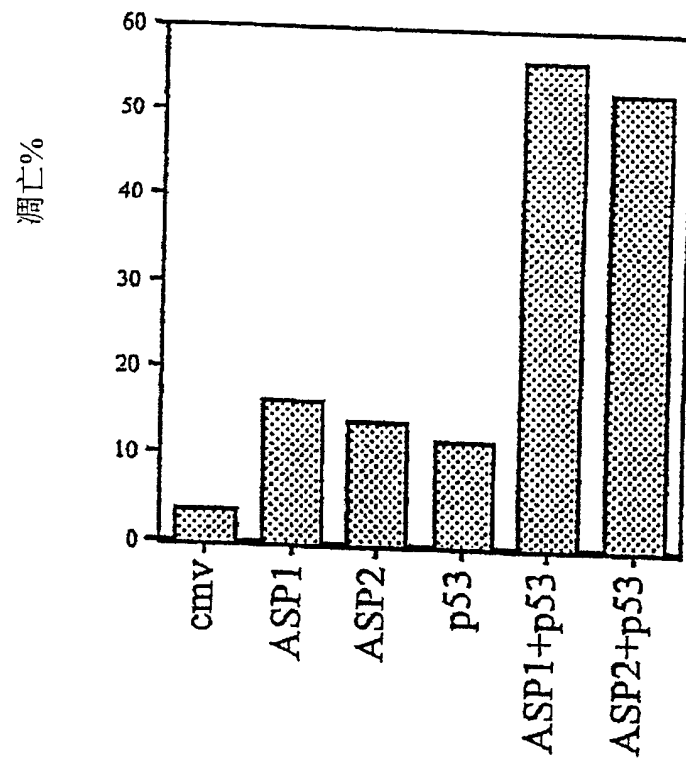


图 7A

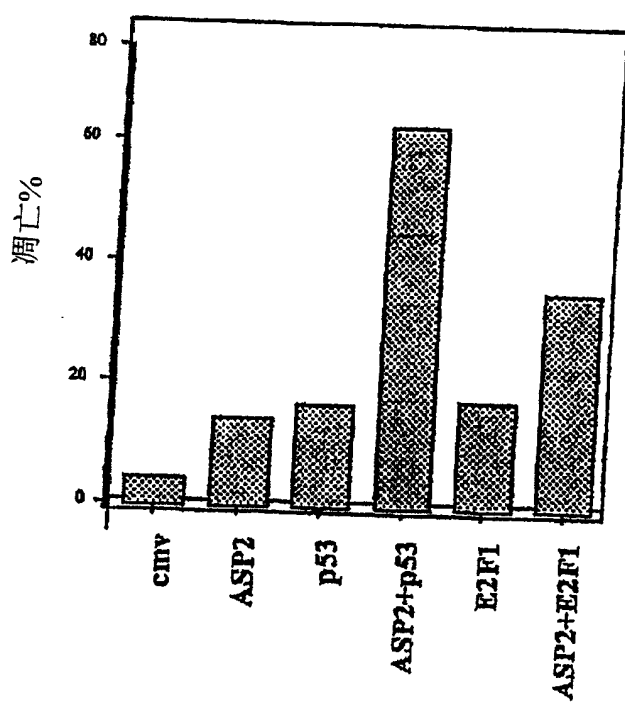


图 7B

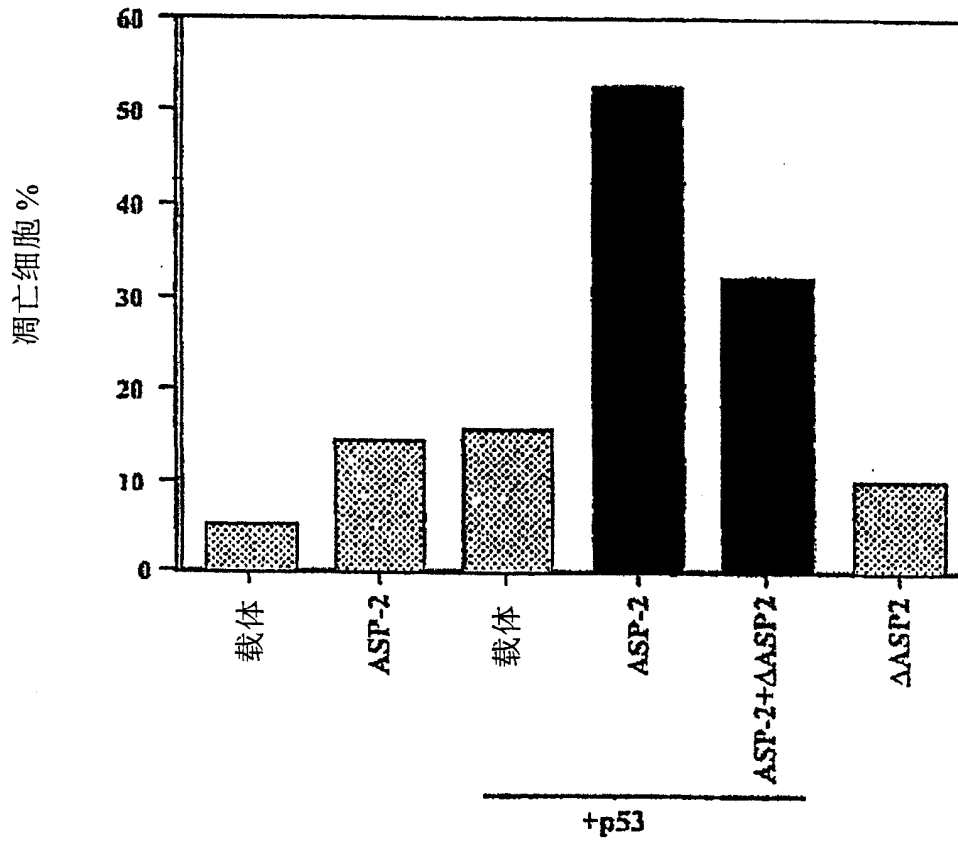


图 7C

细胞因子/(ASP)调节

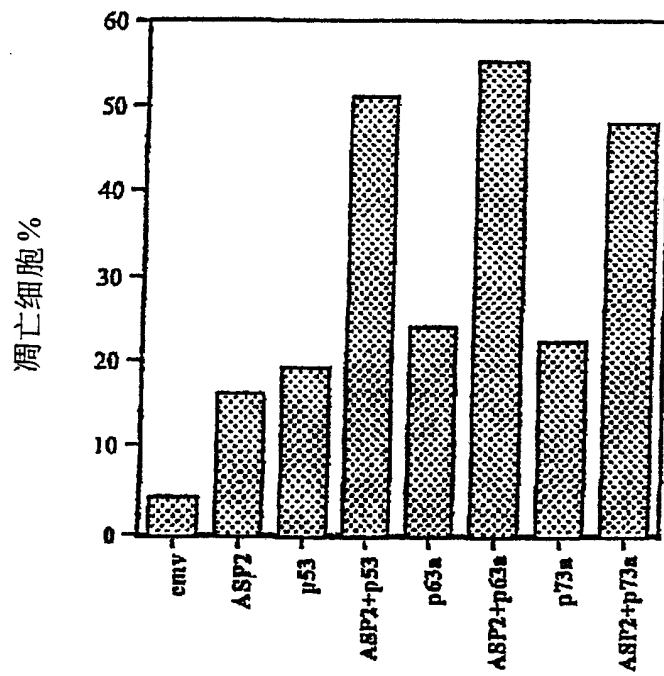


图 7D

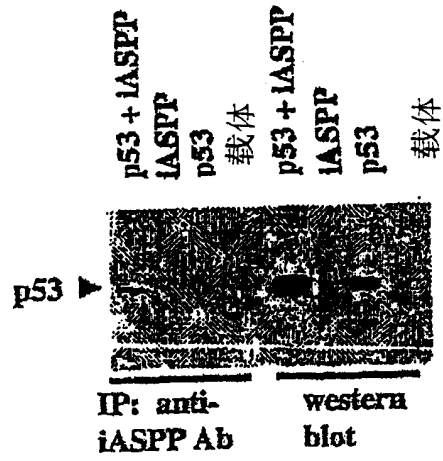


图 8B

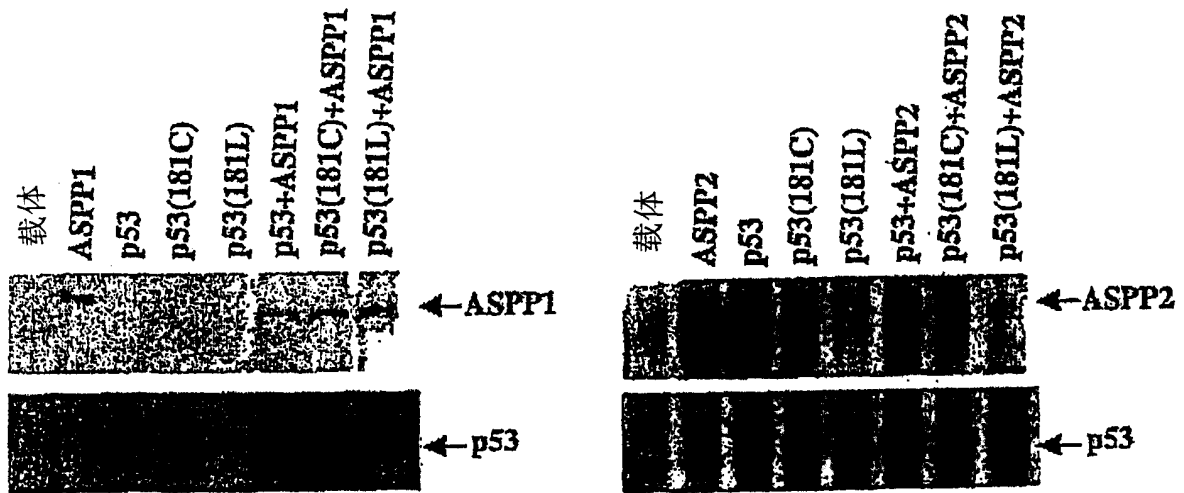


图 8E

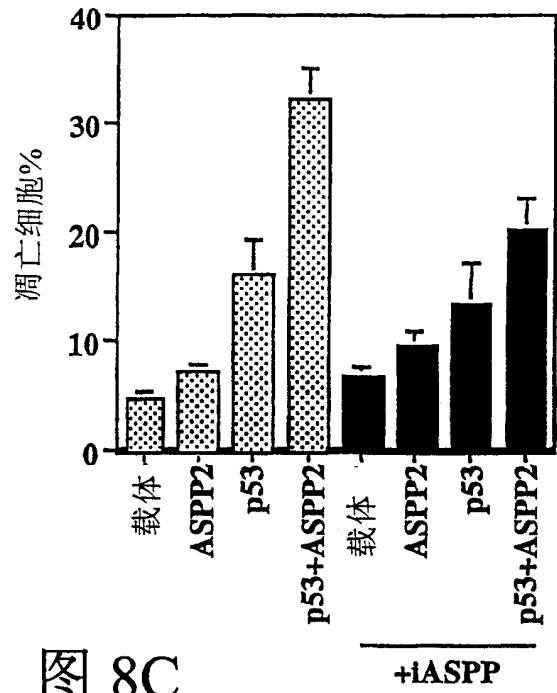
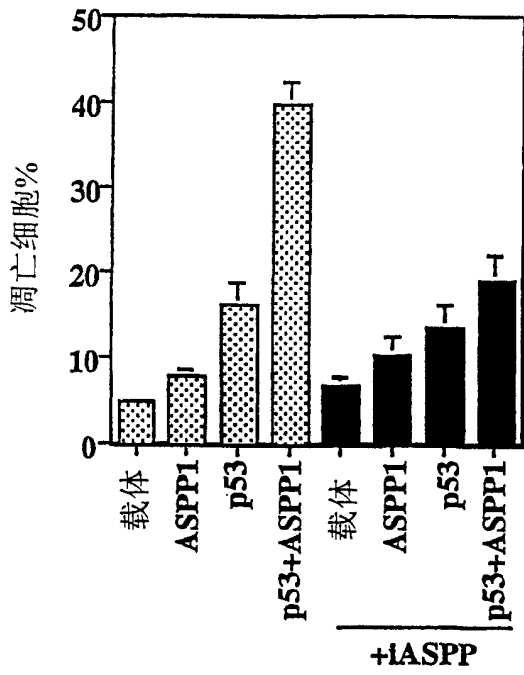


图 8C

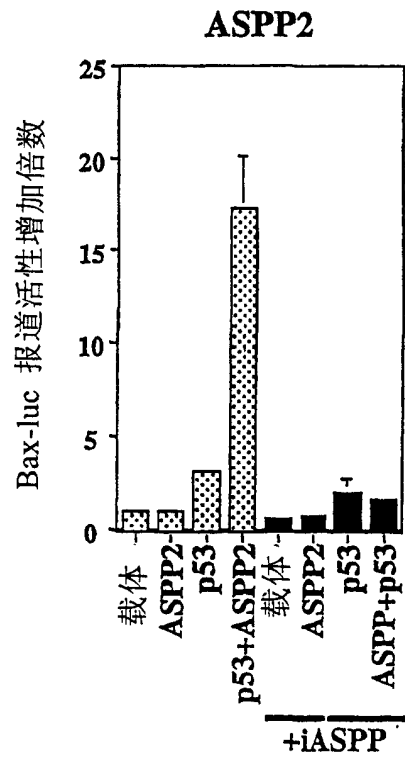
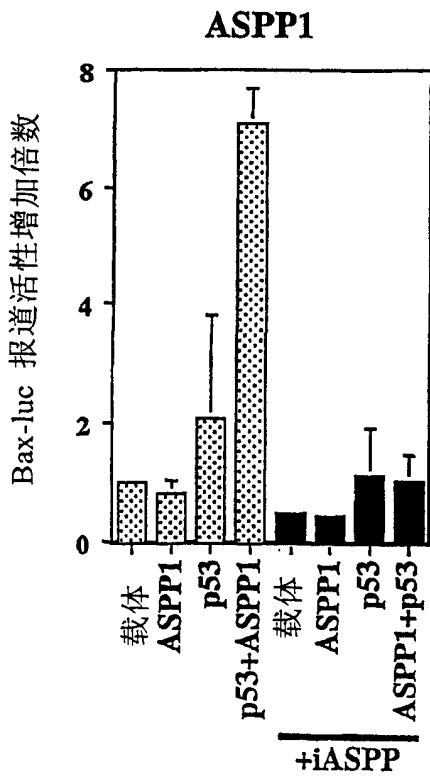


图 8D

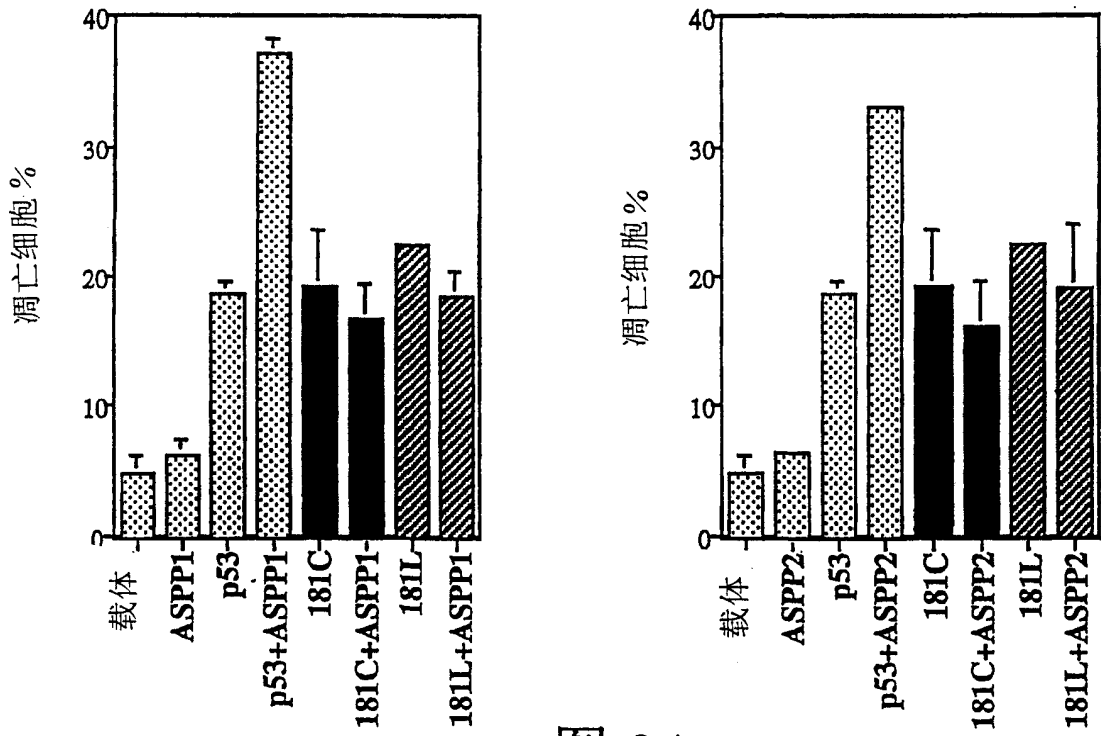


图 9A

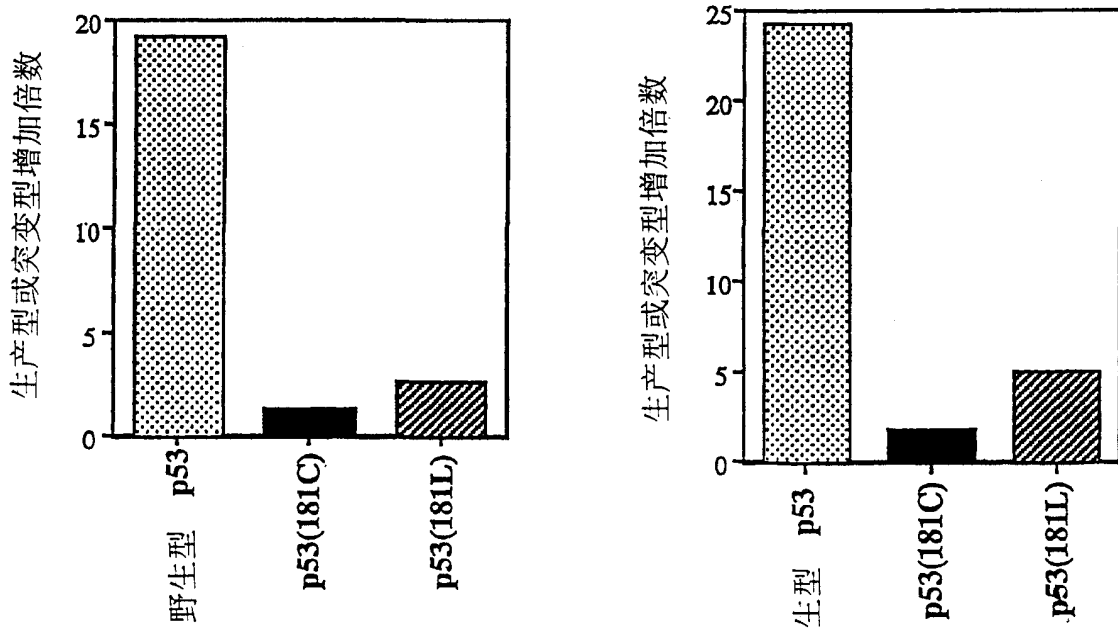


图 9B

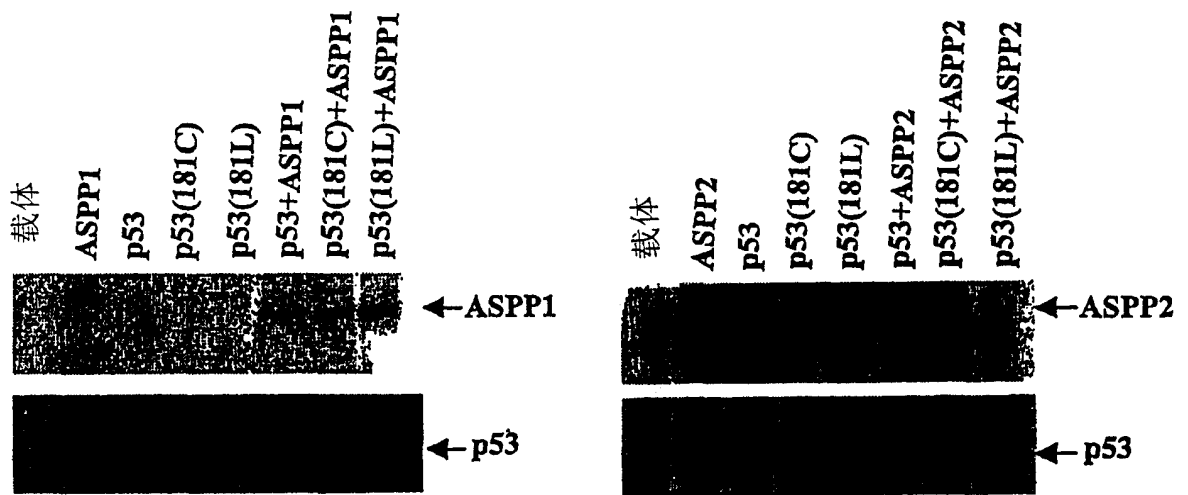


图 9C

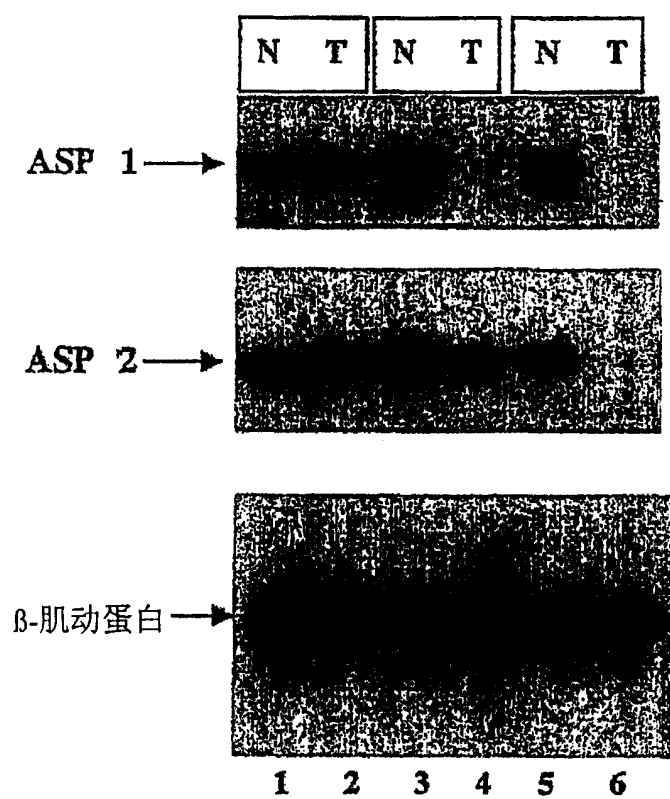


图 9D

```

1 GCGGCCGCGT CGACCCGGCG TTCAGACGCG GGCAGCTACC GGCCTCGCT GGGCTCCGCG
61 GGGCCGTCGG GCACTTTGCC TCGCAGCTGG CAGCCCGTCA GCCGCATCCC CATGCCCCCC
121 TCCAGCCCCC AGCCCCGCGG GGCCCCGCGC CAGCGTCCCA TCCCCTCAG CATGATCTTC
181 AAGTGCAGA ACGCCTTCTG GGAGCACGGG GCCAGCCGCG CCATGCTCCC TGGGTCCCCC
241 CTCTTCACCC GAGCACCCCC GCCTAAGCTG CAGCCCCAAC CACAACCACA GCCCCAGCCA
301 CAATCACAAC CACAGCCCCA GCTGCCCAA CAGCCCCAGA CCCAACCCCA AACCCCTACC
361 CCAGCCTCCC ACATCCGCAT CCCAACAGA CATGGCCCCC TGTGAACGAA GGACCCCCCA
421 AACCCCCAC CGAGCTGGAG CCTGAGCCGG AGATAGAGGG GCTGCTGACA CAGTGTGG
481 AGGTGGCGA TGTGGATGAA GGACCCTGTA GCAAGGCCTC TCAGCCCCAC GAGGCTGCAG
541 CCAGCACTGC CACCGGAGGC ACAGTCGGTG CCCGAGCTGG AGGAGGTGGC ACGGTGTGG
601 GCGGAAATTC CCCGGCCCT CAAACGCAGG GGCTCCATGG AGCAGGCCCC TGCTGTGGCC
661 CTGCCCCCTA CCCACAAGAA ACAGTACCAG CAGATCATCA GCCGCCTCTT CCATCGTCAT
721 GGGGGGCCAG GGCCCGGGG GCGGAGCCAG AGCTGTCCCC CATCACTGAG GGATCTGAGG
781 CCAGGGCAGG GCCCCTGCT CTGCCCCAC CAGTCCCAT TCCACGCCC GGCCCCGTCC
841 CAGAGCAGCC CACCAGAGCA GCCGCAGAGC ATGGAGATGC GCTCTGTGCT GCGGAAGGCG
901 GGCTCCCCGC GCAAGGCCCG CCGCGCGCGC CTCAACCCTC TGGTGTCTCT CCTGGACGCG
961 GCGCTGACCG GGGAGCTGGA GGTGGTGCAG CAGGCGGTGA AGGAGATGAA CGACCCGAGC
1021 CAGCCCAACG AGGAGGGCAT CACTGCCTTG CACAACGCCA TCTGCGGCGC CAACTACTCT
1081 ATCGTGGATT TCCTCATCAC CGCGGGTGCC AATGTCAACT CCCCCGACAG CCACGGCTGG
1141 ACACCCCTGC ACTGCGGGC GTCGTGCAAC GACACAGTCA TCTGCATGGC GCTGGTGCAG
1201 CACGGCGCTG CAATCTTCGC CACCAGCTC AGCGACGGCG CCACCGCCTT CGAGAAGTGC
1261 GACCCTTACC GCGAGGGTTA TGCTGACTGC GCCACCTACC TGGCAGACGT CGAGCAGAGT
1321 ATGGGGCTGA TGAACAGCGG GGCAGTGTAC GCTCTCTGGG ACTACAGCGC CGAGTTCGGG
1381 GACGAGCTGT CTTCCGCGA GGGCGAGTCG GTCACCGTGC TCGGAGGGA CGGGCCGGAG
1441 GAGACCGACT GGTGGTGGC CGCGCTGCAC GGCCAGGAGG GCTACGTGCC GCGGAACTAC
1501 TTCGGGCTGT TCCCCAGGGT GAAGCCTCAA AGGAGTAAAG TCTAGCAGGA TAGAAGGAGG
1561 TTTCTGAGGC TGACAGAAAC AAGCATTCTT GCCTCCCTC CAGACCTCTC CCTCTGTTT
1621 TTGCTGCCTT TATCTGCACC CCTACCCTG CTGGTGGTGG TCCTTGCCAC CGGTTCTCTG
1681 TTCTCCTGGA AGTCCAGGGA AGAAGGAGGG CCCCAGCCTT AAATTTAGTA ATCTGCCTTA
1741 GCCTTGGGAG GTCTGGGAA GGTGGAAAT CACTGGGGAC AGGAAACCAC TTCCTTTTGC
1801 CAAATCAGAT CCCGTCCAAA GTGCCTCCCA TGCCCTACCAC CATCATCACA TCCCCAGCA
1861 AGCCAGCCAC CTGCCAGCC GGGCCTGGGA TGGGCCACCA CACCACTGGA TATTCCTGGG
1921 AGTCACTGCT GACACCATCT CTCCAGCAG TCTTGGGGTC TGGGTGGGAA ACATTGGTCT
1981 CTACCAGGAT CCCTGCCCA CCTCTCCCA ATTAAGTGCC TTCACACAGC ACTGGTTTAA
2041 TGTTTATAAA CAAAATAGAG AAAGTGGTTT AATGTTTATA AACAAAATAG AGAAACTTTC
2101 GCTTATAAAT AAAAGTAGTT TGCACAGAAA TGAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

```

图 10

MWMKDPVARPLSPTRLQPALPPEAQSVPELEEVARVLAIEPRPL
KRRGSMEQAPAVALPPTHKKQYQQIISRLFHRHGGPGPGGRSQSCPPSLRDLRPGQGP
LLLPHQLPFHRPAPSQSSPPEQPQSMEMRSVLRKAGSPRKARRARLNPLVLLDAALT
GELEVQQAQVEMNDPSQPNEEGITALHNAICGANYSIVDFLITAGANVNSPDSHGWT
PLHCAASCNDTVICMALVQHGAAFATLSDGATAFEKCDPYREGYADCATYLADVEQ
SMGLMNSGAVYALWDYSAEFGDELDFREGESVTVLRRDGPEETDWWAALHGQEGYVP
RNYFGLFPRVKPQRSK

图 11

图 12A

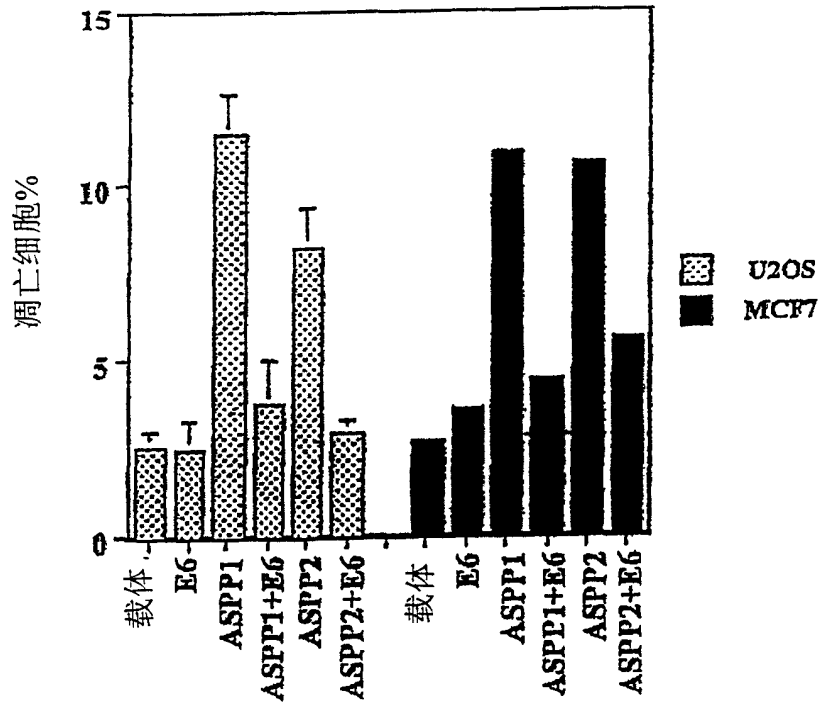


图 12B

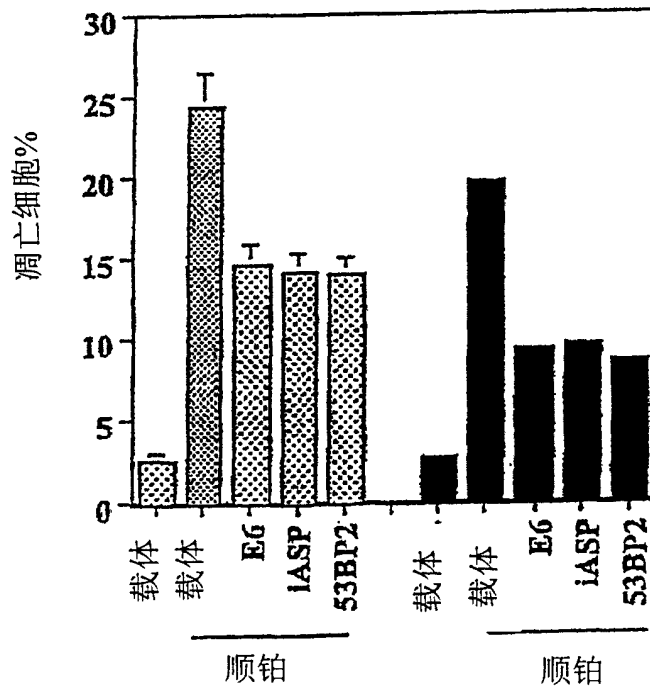


图 12C

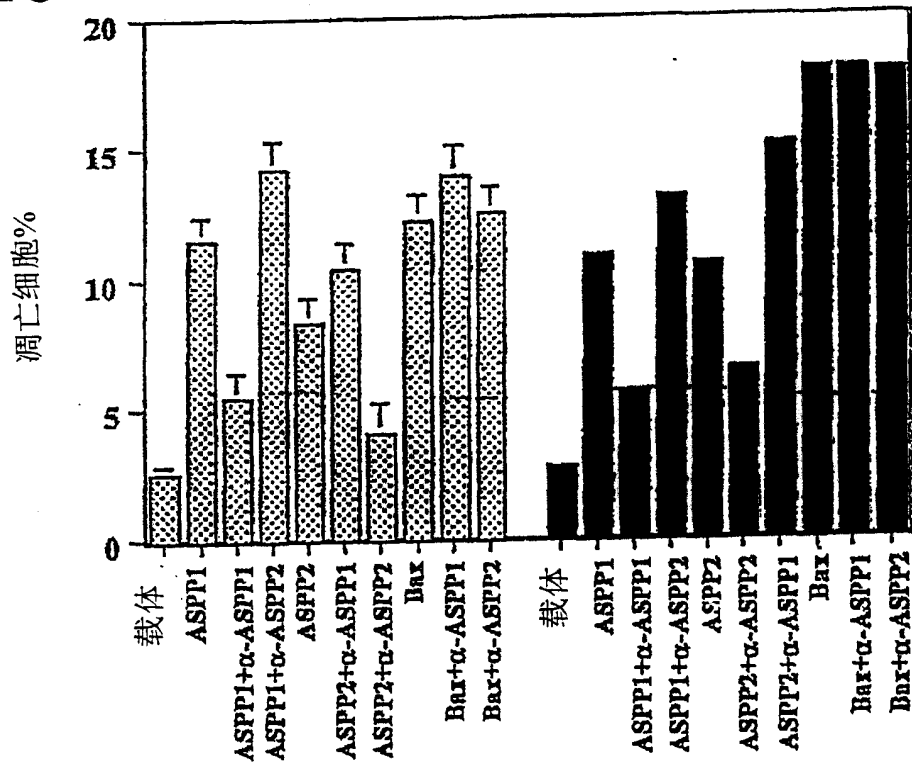
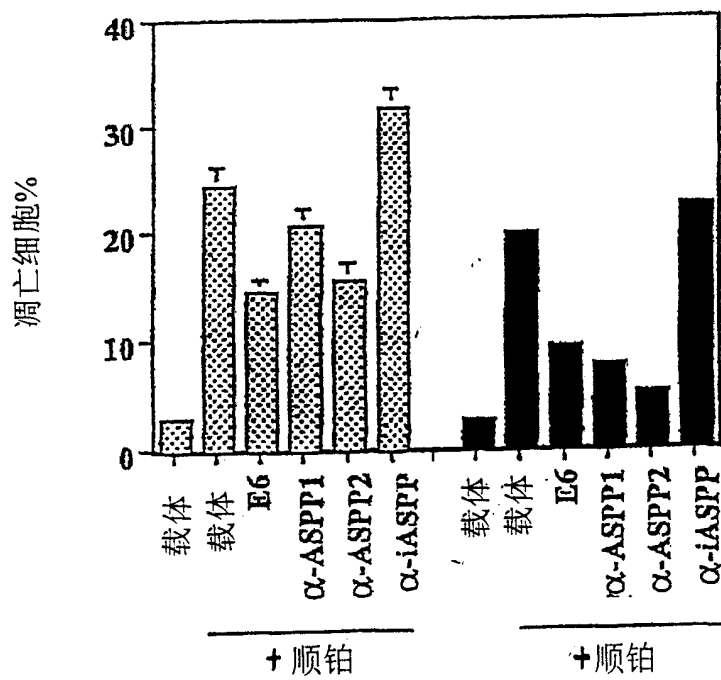


图 12D



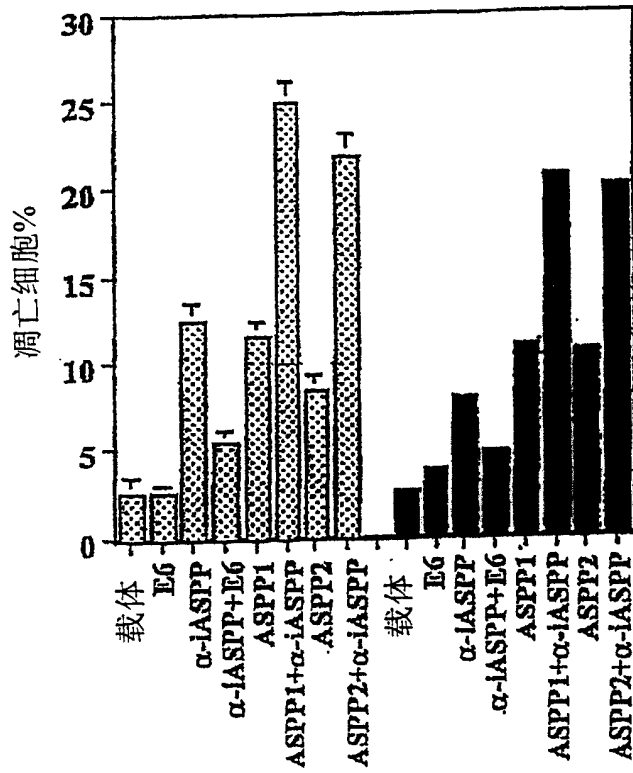


图 12E

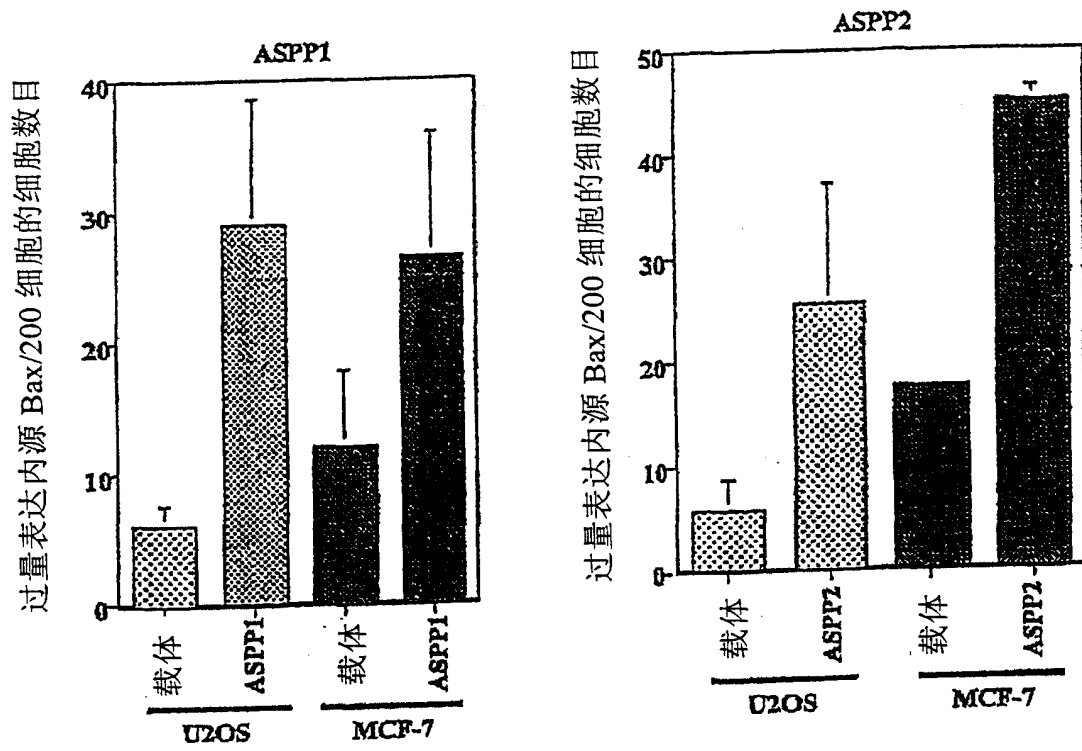


图 12F

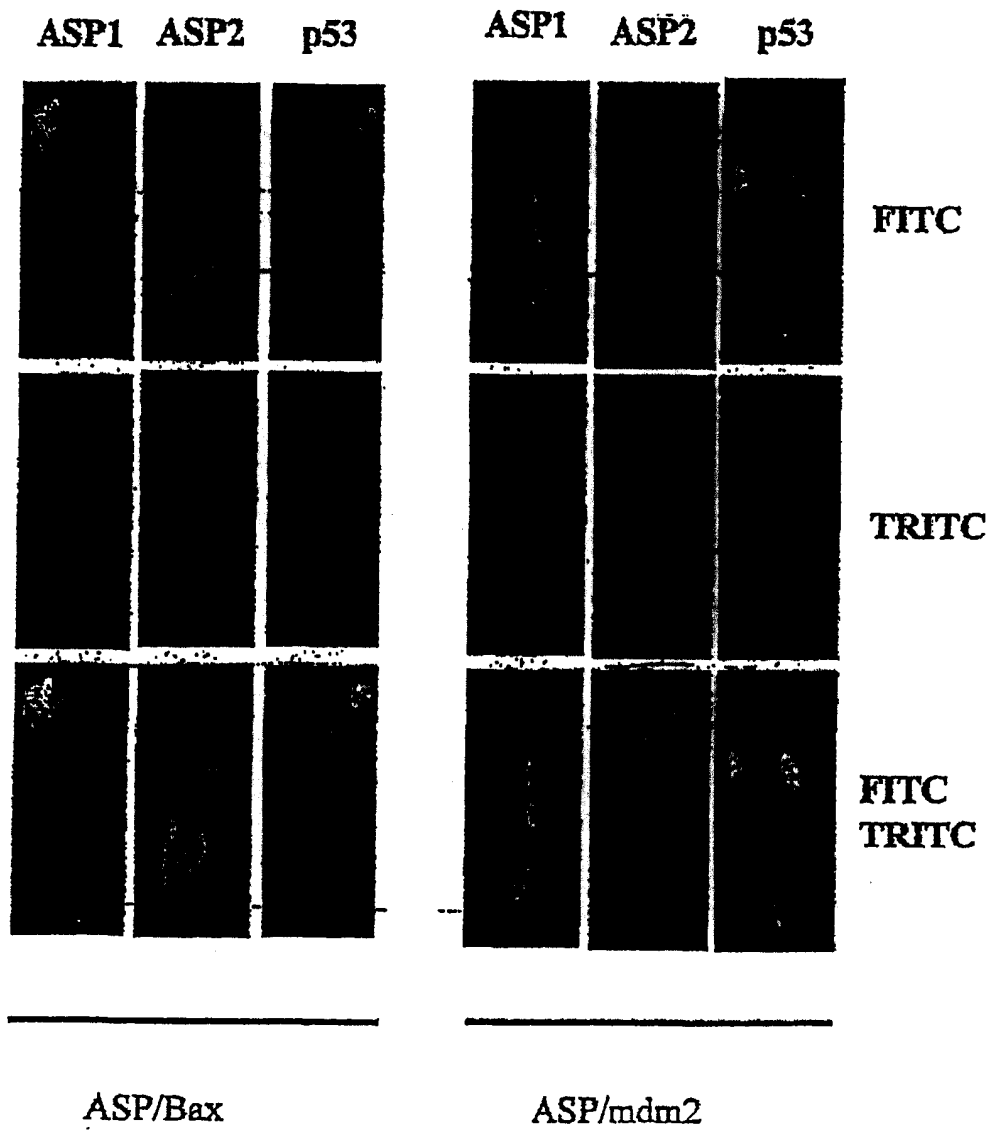


图 12G

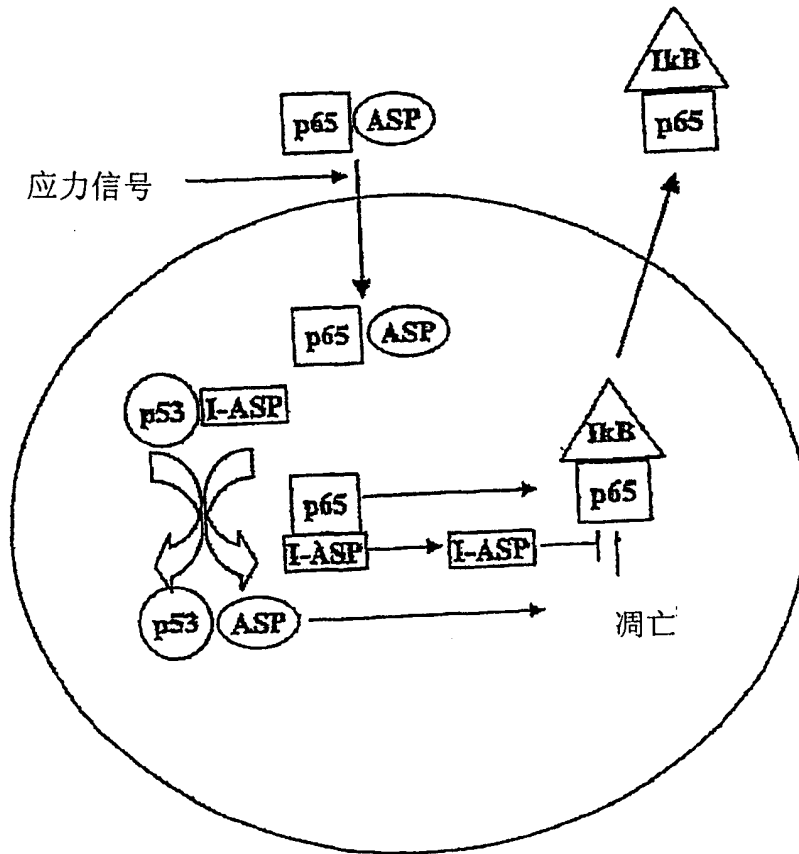


图 13A

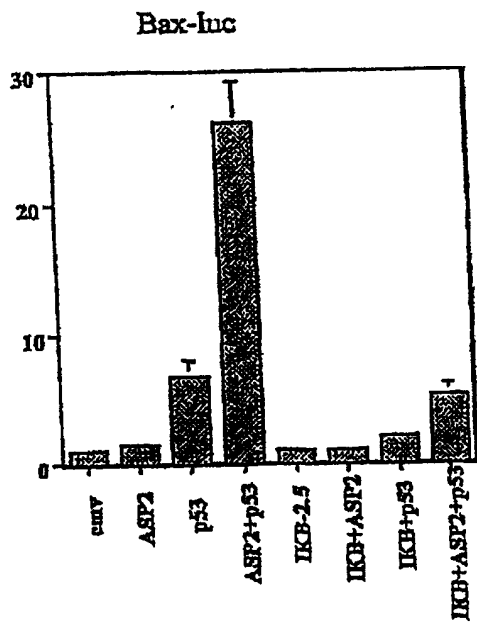


图 13C

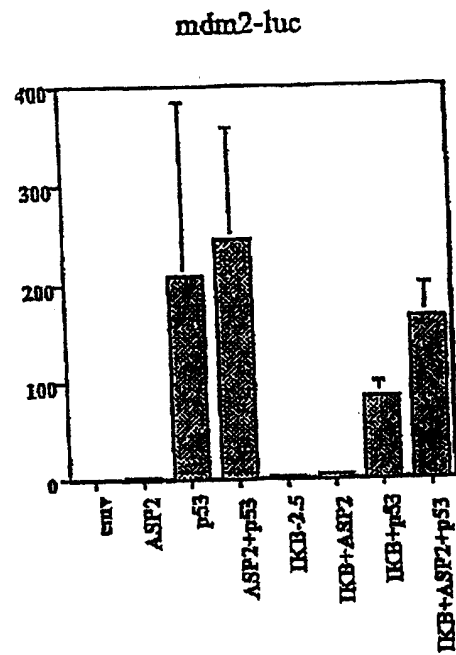


图 13D

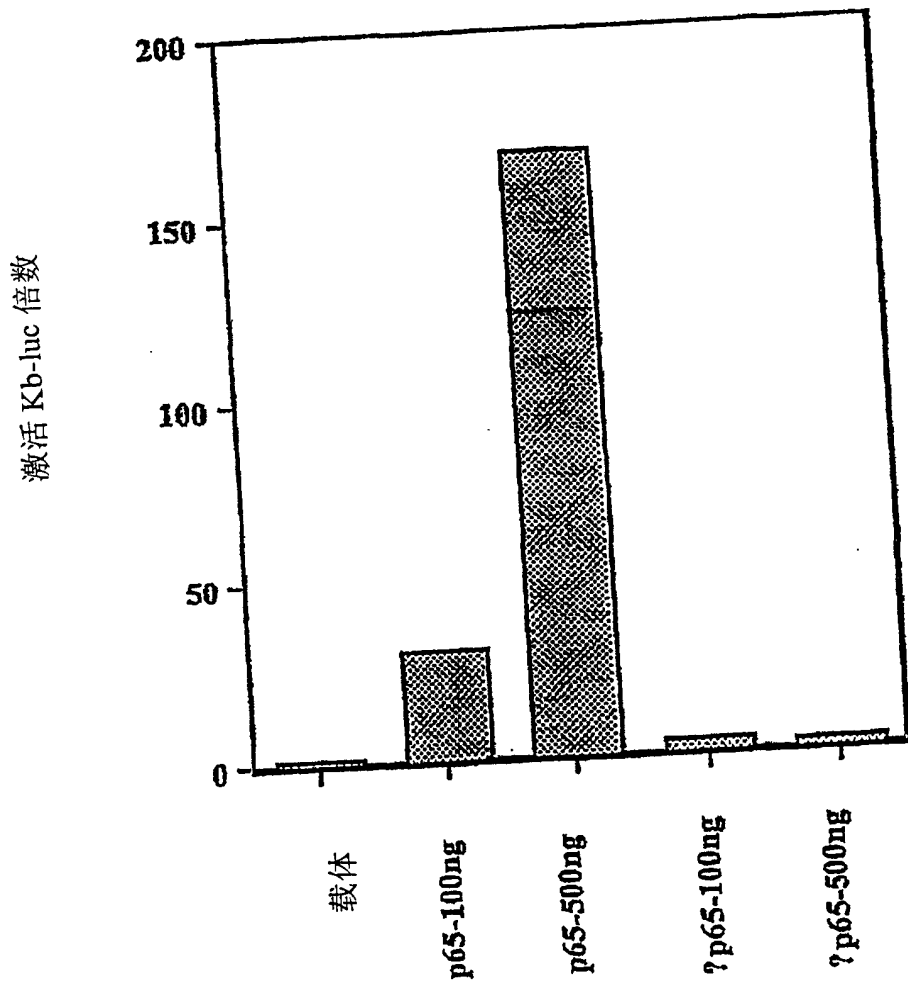


图 14A

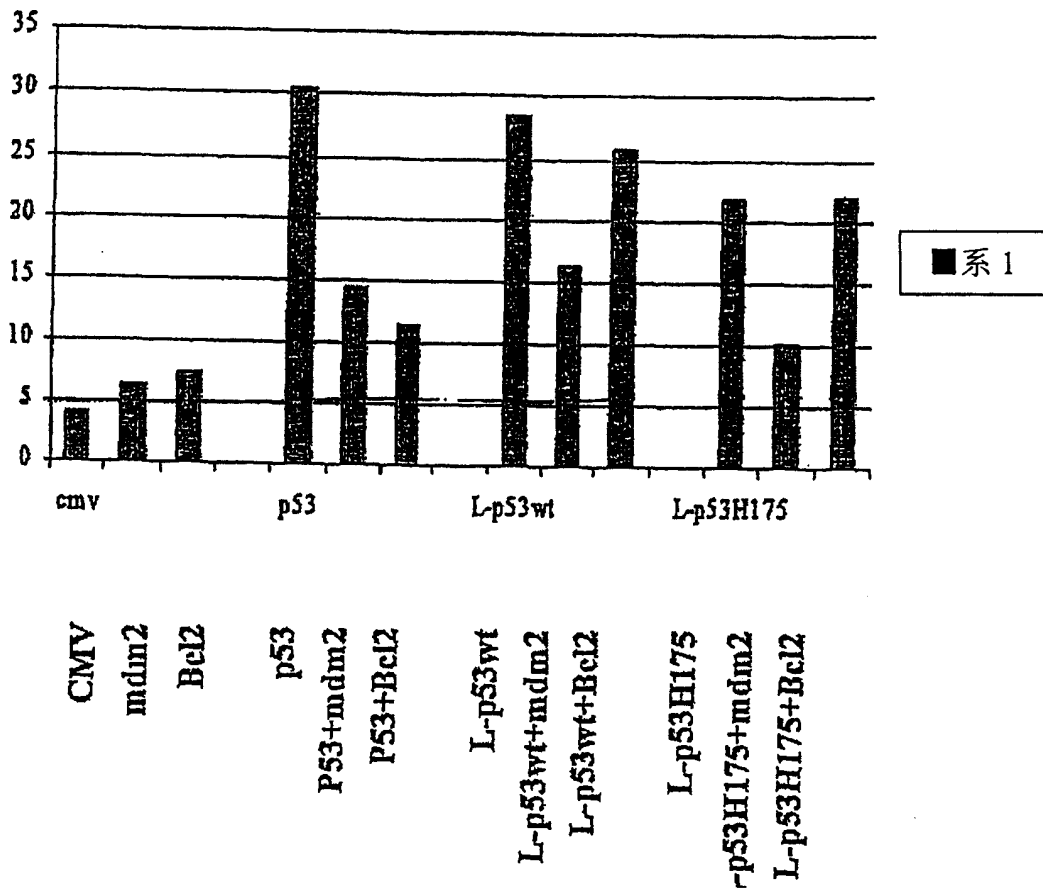


图 15A

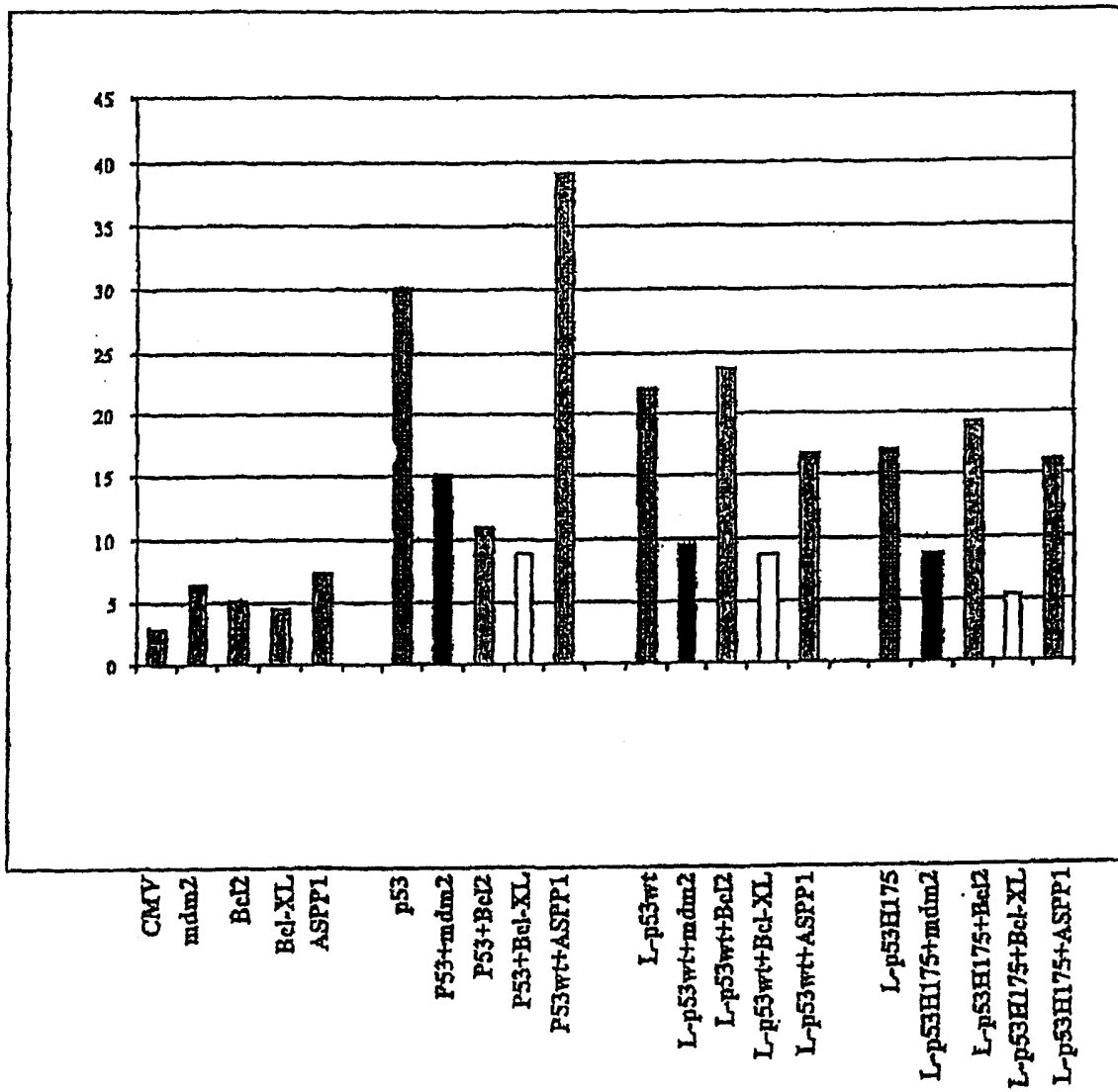


图 15B

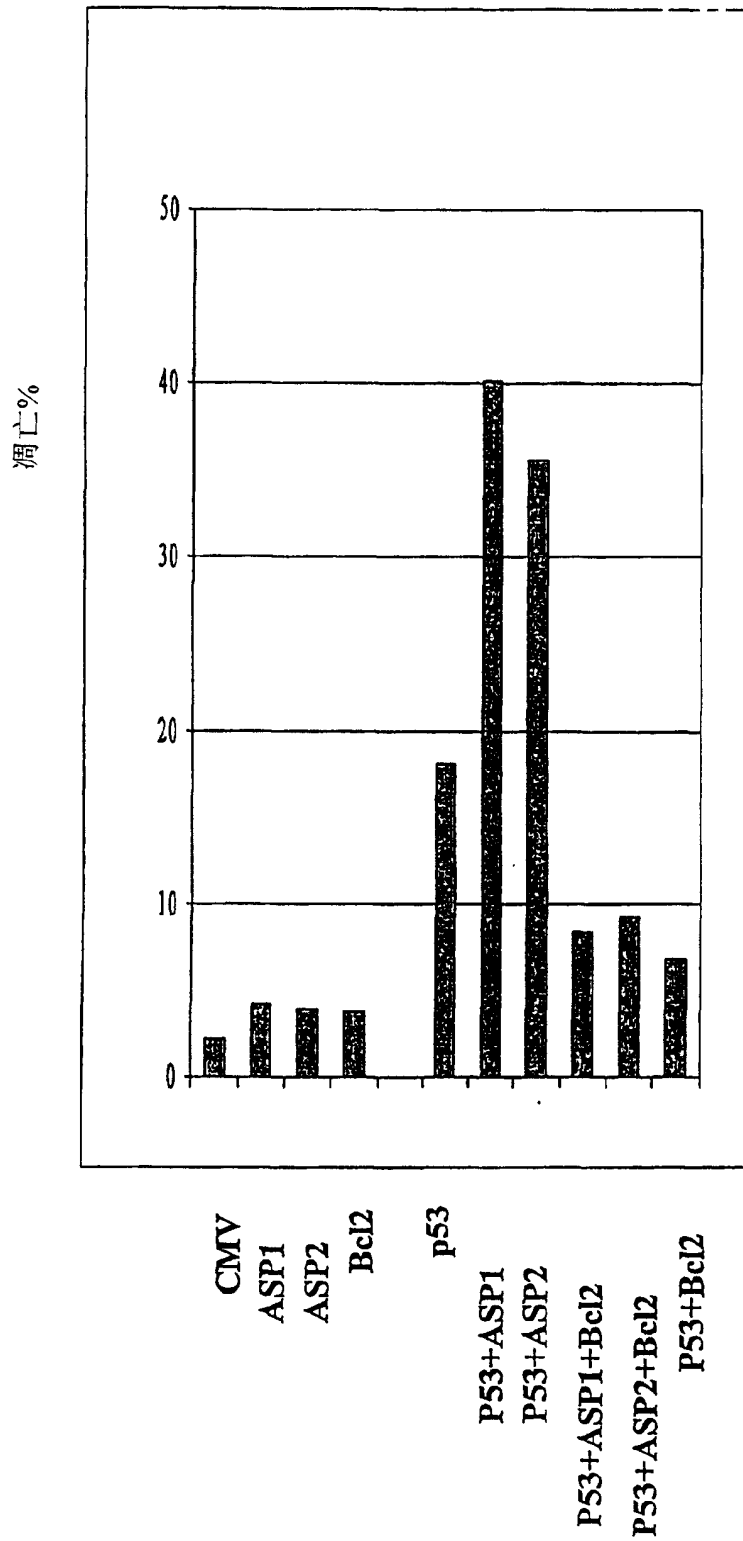


图 15C

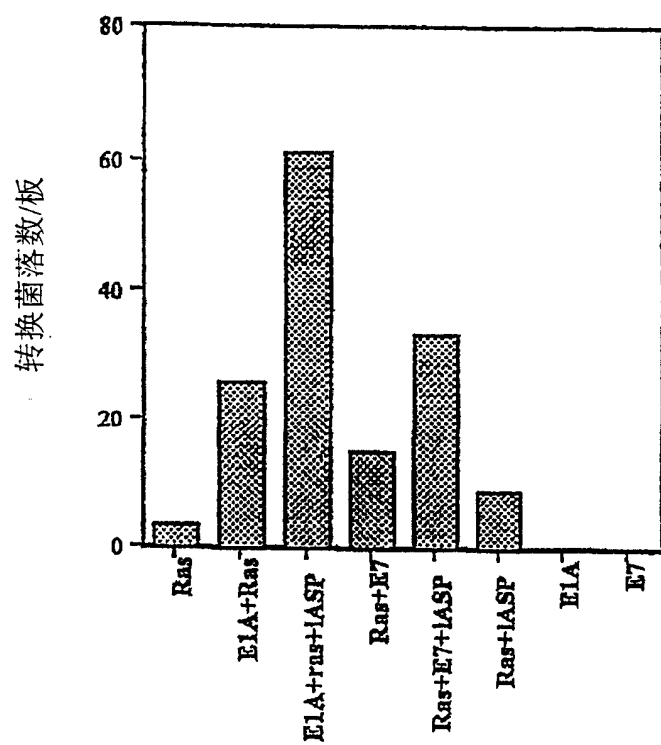


图 16A

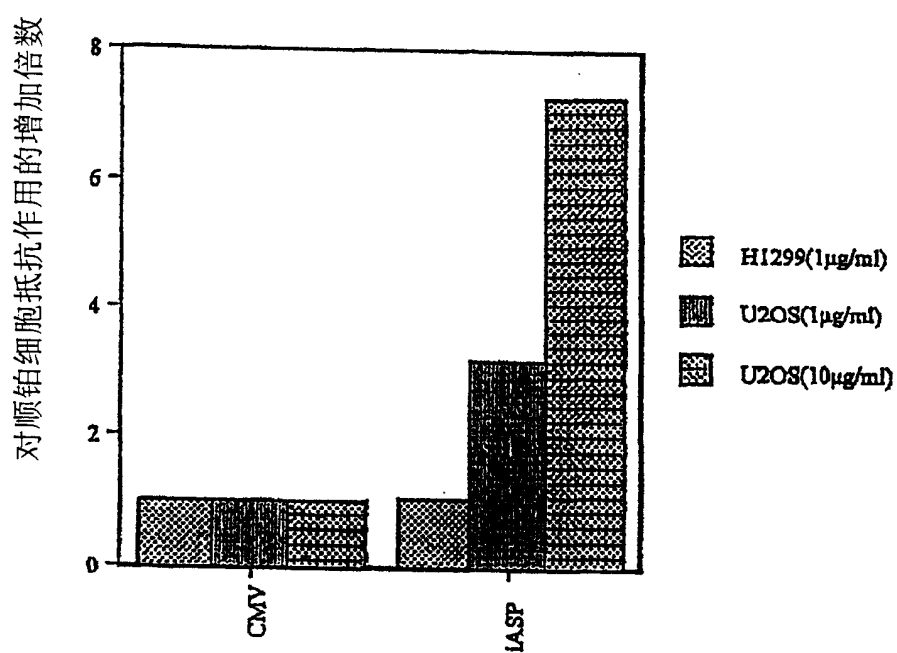


图 16B