

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99804151.3

C12N 15/12

C12N 5/10

C07K 14/47

C07K 16/18

G01N 33/50

A61K 38/17

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1232641C

[22] 申请日 1999.3.18 [21] 申请号 99804151.3

[30] 优先权

[32] 1998. 3. 19 [33] IL [31] 123758

[32] 1998. 9. 1 [33] IL [31] 126024

[86] 国际申请 PCT/IL1999/000158 1999. 3. 18

[87] 国际公布 WO1999/047672 英 1999. 9. 23

[85] 进入国家阶段日期 2000. 9. 19

[71] 专利权人 耶达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特市

共同专利权人 耶欣望大学阿尔伯特爱因斯坦医学院

[72] 发明人 大卫·沃勒克 安德烈·科瓦连科

马歇尔·S·霍维茨 李永安

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书 2 页 说明书 85 页 附图 27 页

[54] 发明名称 TNF/NGF 受体家族和其它蛋白质的受体的功能的调节剂

[57] 摘要

本发明提供一种新的蛋白质，能在炎症、细胞存活和细胞死亡途径中调节/介导细胞内的 RIP 活性。本发明还提供 DNA 编码，它的生产方法和用途。

ISSN 1008-4274

1. 编码RIP-相关蛋白质-2RAP-2蛋白质的DNA序列，其中RAP-2蛋白质能够结合到RIP，所述DNA序列包括下述之一：

(a) 如图1所示的序列；

(b) 编码(a)中片段的序列；或

(c) 编码(a)或(b)的类似物的序列，该(a)或(b)的类似物与(a)或(b)的蛋白质相比在氨基酸序列中有不超过10个的变化，所述每一个变化为一个单独氨基酸的替代、去除和/或插入，所述片段或类似物能够结合到RIP。

2. 根据权利要求1所述的编码RAP-2蛋白质的DNA序列，其中RAP-2蛋白质能够结合到RIP，所述DNA序列由图1所示的核苷酸154-1410或其片段构成。

3. 可复制的表达载体，包括权利要求1或2所述的DNA序列。

4. 根据权利要求3所述的可复制的表达载体，其可操作连接到常规的对照序列、启动子或允许以正确的方向表达的其它DNA序列。

5. 根据权利要求3所述的可复制的表达载体，能够在真核细胞中表达。

6. 根据权利要求3所述的可复制的表达载体，能够在原核细胞中表达。

7. 转化的真核或原核宿主细胞，含有权利要求3~6中任一项所述的可复制的表达载体。

8. 一种RAP-2蛋白质或其片段，是由权利要求1或2所述的DNA序列编码的，能够结合到RIP。

9. 根据权利要求8所述的RAP-2蛋白质或其片段，能够调节或介导RIP在炎症、细胞存活或细胞死亡途径中的RIP胞内活性，其中RIP通过与这些途径的内调节剂或介导剂直接或间接结合参与这些途径。

10.根据权利要求8所述的RAP-2蛋白质或其片段,其中所述的蛋白质或其片段具有图3所示的氨基酸序列。

11.生产权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质或其片段的方法,包括在适用于表达所述的蛋白质或其片段的条件下转化权利要求7所述的转化宿主细胞,实现转译后的修饰,以获得所述的蛋白质或其片段,和分离所述的表达的蛋白质或其片段。

12.抗体,与权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质或其片段具有特异性。

13.根据权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质或其片段在制备用于调节或介导RIP调节或介导的对炎症、细胞死亡或细胞存活途径的胞内作用的药物中的用途。

14.根据权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质或其片段在制备用于治疗肿瘤细胞或HIV感染的细胞的药物中的用途。

15.根据权利要求12所述的抗体在制备用于调节RIP调节/介导的对细胞的作用的药物中的用途。

16.调节RIP对细胞的作用的药物组合物,包括作为活性成份的至少权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质、其生物学活性片段或其混合物。

17.调节RIP对细胞的作用的药物组合物,包括编码能够结合细胞表面受体的蛋白质和编码权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质、生物学活性片段的重组动物病毒载体。

18.调节RIP对细胞的作用的药物组合物,包括作为活性成份的编码权利要求1或2所述的RAP-2蛋白质的DNA序列的反义序列的寡聚核苷酸序列。

19.根据权利要求8~10中任一项所述的RAP-2蛋白质的片段,该片段是肽。

TNF/NGF受体家族和其它蛋白质的受体的功能的调节剂

发明领域

总的来说本发明涉及属于TNF/NGF超级家族的受体和其生物学功能的控制领域。TNF/NGF超级家族的受体包括受体例如p55和p75肿瘤坏死因子受体(TNF-Rs, 下文中称为p55-R和p75-R)和FAS配体受体(也称为FAS/APO1或FAS-R和下文将称为FAS-R)和其它。特别地, 本发明涉及结合到其它蛋白质的新的蛋白质, 所述的其它蛋白质是本身直接或间接结合到TNF/NGF受体家族的成员和其它胞内调节蛋白质。

更具体地说, 涉及一种在此被称为RAP-2(对于RIP-相关蛋白质-2)的蛋白质, 和其同型, 片段, 衍生物以及结合到RAP-2的蛋白质。

RAP-2结合到RIP(“受体相互作用蛋白质”)并且能够调节或介导RIP的功能并且从而也能够直接或间接调节或介导直接或间接结合到RIP的其它蛋白质的功能。RAP-2结合蛋白质是RAP-2功能的调节剂/介导剂。

相关领域的背景技术

肿瘤坏死因子(TNF- α)和淋巴细胞毒素(TNF- β)(下文中称为TNF, 涉及TNF- α 和TNF- β)是主要由单核细胞吞噬细胞形成的多功能的炎症性的细胞因子, 它定义细胞有许多作用Wallach,

D.(1986)参见：干扰素7(Ion Gresser, ed.), pp.83-122, 学术出版社, 伦敦; 和Beutler和Cerami(1987)。TNF- α 和TNF- β 通过结合到特异性的细胞表面受体启动其作用。一些效果有利于生物体：例如它们可能毁坏肿瘤细胞或病毒感染的细胞和增加粒性白细胞的抗细菌活性。以这种方式，TNF有助于生物体对抗肿瘤和感染因子的防御和有助于从受伤中恢复。因此TNF可以作为抗肿瘤剂，在该申请中它结合到肿瘤细胞表面的受体，从而启动导致肿瘤细胞死亡的情况发生。TNF也可以用作抗感染剂。

但是，TNF- α 和TNF- β 也具有有害的作用。有证据表明TNF- α 的过量产生在几种疾病中起着主要的病理作用。例如，主要对脉管系统有作用INF- α 已知是脓毒性的休克症状的主要原因(Tracey等人, 1986)。在一些疾病中，TNF通过抑制脂肪细胞的活性和通过引起食欲缺乏可以引起体重过多的损失(恶病质)，和因此TNF- α 被称为cachetin。也将它描述为在风湿病的疾病中对组织有损害的介导剂(Beutler和Cerami, 1987)和作为在移植-对-宿主反应中观察到的损害的介导剂(Piquet等人, 1987)。另外已知TNF参与发炎和许多其它疾病的过程。

特定地结合TNF- α 和TNF- β 的两个不同的独立地表达受体p55和p75 TNF-Rs开始和/或介导上述TNF的生物学作用。这能够受体结构上已经具有不同的胞内区域，表明它们形成不同的信号(参见Hohmann等人, 1989; Engelmann等人, 1990; Brockhaus等人, 1990; Leotscher等人, 1990; Schall等人, 1990; Nophar等人, 1990; Smith等人, 1990; 和Heller等人, 1990)。但是，

至今没有阐述参与p55和p75 TNF-Rs胞内成信号的细胞原理例如各种蛋白质和可能的其它因子。这就是胞内形成信号，通常出现在配体即TNF(α 或 β)与受体结合之后，其作用是最终导致在观察到的细胞对TNF的应答中级联反应的开始。

对于至今在研究的大多数细胞中上面特定的TNF的杀细胞作用，该作用主要通过p55 TNF-R触发。抗p55 TNF-R的胞内区域(配体结合区域)的抗体本身能够触发杀细胞作用(参见EP 412486)，这与由抗体交叉连接的受体的效果相关，据信是胞内的信号形成过程产生的第一步。从而，突变的研究已经证明(Brakebusch等人，1992；Tartaglia等人，1993)p55 TNF-R的生物学功能取决于其胞内区域的整体性。因此，已经暗示导致TNF的杀细胞作用的表明信号形成的开始出现是由于一个或多个p55 TNF-R胞内区域的关联的结果。而且，TNF(α 和 β)出现在同源三聚体的形式，这样已经暗示借助于p55 TNF-R根据其结合和交叉连接该受体分子的能力诱导表明信号的形成，即引起受体凝聚。

TNF/NGF 超级家族的受体另一个成员是 FAS 受体(FAS-R)，也将其称之为 FAS 抗原，在各种组织表达的细胞表面蛋白质和与包括 TNF-R 和 NGF-R 的细胞表面受体的成员具有同源性。FAS-R 在细胞凋亡中介导细胞死亡(Itoh 等人，1991)，并且显示用作为自体反应 T 细胞的负选择剂，即 T 细胞的成熟过程中，FAS-R 介导 T 细胞识别的自体抗原的程序化死亡。还已经得出了 FAS-R 基因(lpr)的突变引起小鼠的淋巴细胞增殖的紊乱，这类似于人自体免疫疾病系统 lupus erythematosus(SLE) (Watanabe-

Fukunaga 等人, 1992)。FAS-R 的配体似乎是致死性 T 细胞携带的细胞表面相关的分子(细胞毒性 T 淋巴细胞 CTLs), 因此当 CTLs 与携带 FAS-R 的细胞接触时, 它们能够诱导携带 FAS-R 细胞的程序性细胞死亡。此外, 已经制备了单克隆抗体, 它是与 FAS-R 特异性的, 这些单克隆抗体能够诱导携带 FAS-R 细胞的程序性细胞死亡, 包括由 cDNA 编码的人转化的小鼠细胞 FAS-R(Itoh 等人, 1991)。

申请人已经制备了许多途径(参见实施例, 欧洲专利第 EP186833, EP308378, EP398327和EP412486号申请), 这些途径通过利用抗TNF抗体或通过利用可溶性TNF受体以便竞争TNF结合到细胞表面结合的TNF-Rs, 通过抑制TNF与其受体的结合调节TNF的有害作用。此外, 基于TNF结合到其受体是TNF诱导细胞作用所需要的, 申请人已经制备的途径(参见例如EP 568925)通过调节TNF-Ps的活性调节TNF的作用。

简单地说, EP 568925涉及调节信号转导和/或裂解TNF-Rs的方法, 从而肽或其它分子可以与受体本身或与受体相互作用的效应子蛋白质相互作用, 因此调节TNF-Rs的正常功能。对于EP 568925, 描述了在p55 TNF-R的胞外, 膜内和胞内区域具有突变的各种突变体p55 TNF-P的构建和特征。以这种方式, 将p55 TNF-R的上述区域内的区域鉴别为是受体的功能所必须的, 即配体(TNF)的结合和随后的信号转导和胞内信号形成最大限度地导致观察到TNF对细胞的作用。此外, 还描述了分离和鉴别蛋白质, 肽或其它因子的许多途径, 所述的因子能够参与调节或协调的TNF-R的活性。分离和克隆编码这样的蛋白质, 肽的DNA

序列的许多途径，所述的DNA用于构建用于生产这些蛋白质和肽的表达载体，和与TNF-R或与上述的蛋白质和肽相互作用的用于制备抗体或其片段，也已经在EP 568925中公开了，其中所述的蛋白质或肽结合TNF-R的各种区域。但是，EP 568925没有限定实际的蛋白质和肽，它们结合到TNF-Rs的胞内区域(例如，p55 TNF-R)，它没有描述分离和鉴别这样的蛋白质或肽的酵母的两种杂交途径，所述的蛋白质和肽结合到TNF-Rs的胞内区域。类似地，EP 568925没有公开能够结合到FAS-R的胞内区域的蛋白质或肽。

然而众所周知，肿瘤坏死因子(TNF)受体和结构上相关的受体FAS-R，由于白细胞产生的配体的刺激和细胞中激发破坏性活性，导致其自身死亡，所以该激发过程的机理仍然了解得很少。突变研究表明有关细胞毒性在FAS-R和p55 TNF受体(p55-R)信号形成时涉及胞内区的不同的区域(Brakebusch等人，1992；Tartaglia等人，1993；Itoh和Nagata，1993)。这些区域(死亡区域)具有类似的序列。FAS-R和p55-R的死亡区域趋向于自我关联。它们的自我关联明显促进了信号形成的启动所必要的受体的凝聚(参见Song等人，1994；Wallach等人，1994；Boldin等人，1995)，受体的高水平表达导致独立于配体信号形成的激发(Boldin等人，1995)。

与其它受体诱导的作用类似，由TNF受体和FAS-R诱导的细胞死亡通过一系列的蛋白质-蛋白质相互作用发生，导致从配体-受体的结合到最终的酶促效应子功能的激发的转变，在这种情况下，研究工作已经阐明了非酶蛋白质-蛋白质相互作用，这种

作用启动细胞死亡的信号形成：三聚体TNF或FAS-R配体分子与受体的结合，由申请区域基序倾向于自我关联(Brakebusch等人，1992；Tartaglia等人，1993；Itoh和Nagata，1993)，增加了最后其胞内分子相互作用(Boldin等人，1995a)，并且诱导两个细胞质的蛋白质(也可以相互结合)到受体胞内区域-MORT-1(或FADD)到FAS-R(Boldin等人，1995b；Chinnaiyan等人，1995；Kischkel等人，1995)和TRADD结合到p55-R(Hsu等人，1995；Hsu等人，1996)。在死亡区域结合到FAS-R and p55-R胞内区域的三个蛋白质由受体通过同源区域的异源关联参与细胞死亡的诱导，并且也能够独立地激发细胞死亡，这三个蛋白质由酵母的两个杂交筛选程序鉴别。其中之一是蛋白质，MORT-1(Boldin等人，1995b)也已知为FADD(Chinnaiyan等人，1995)，它特异性地与FAS-R结合。第二个是TRADD(也参加Hsu等人，1995，1996)结合到p55-R，和第三个RIP(也参加Stanger等人，1995)，结合到FAS-R和p55-R。除了结合到FAS-R和p55-R，这些蛋白质也能够互相结合，这提供了FAS-R和p55-R之间的功能性“相互交谈”(“cross-talk”)。这些结合通过保守的序列的基序出现，“死亡区域分子”，受体和它们的相关蛋白质一样如此。此外，虽然酵母的两个杂交测试中证明哺乳动物细胞中MORT-1自发地结合到FAS-R，其结合仅发生在受体刺激之后，暗示MORT-1参与FAS-R信号形成的启动。MORT-1不含有酶促活性的任何序列基序的特征，因此它激发细胞死亡的能力似乎不涉及MORT-1本身的内在活性，但是，一些结合到MORT-1的其它蛋白质的活化并且进一步在信号形成级联的下游起作用。已经证明失去该分子

的N-末端部分的MORT-1突变体的细胞表达通过FAS/APO1(FAS-R)或p55-R阻止细胞毒性的诱导(Hsu等人, 1996; Chinnalyan等人, 1996), 表明该N-末端区域通过蛋白质-蛋白质的相互作用转移两个受体杀细胞作用的信号形成。

因此, 受体p55-R和FAS-R的“死亡区域的基序”以及它们三个相关的蛋白质MORT-1, RIP和TRADD似乎是蛋白质-蛋白质相互作用的位置。三个蛋白质MORT-1, RIP和TRADD与p55-R和FAS-R胞内区域相互作用。通过其死亡区域与这些受体的死亡区域结合, 对于RIP和TRADD其死亡区域也自我关联, (虽然MORT-1在这一方面的不同, 其死亡区域不自我关联)。此外MORT-1和TRADD分别结合到FAS-R和p55-R并且也互相结合。而且MORT-1和TRADD有效地结合到RIP。因此, 似乎三个蛋白质MORT-1, RIP和TRADD之间的相互作用是由该三个蛋白质介导的胞内信号形成的总的调节的一部分。这三个胞内蛋白质的相互作用的干扰导致由该作用引起的调节。例如, TRADD结合到MORT-1的抑制可以调节FAS-R-p55 TNF-R的相互作用。另外, 除了上述TRADD结合到MORT-1的抑制, RIP的抑制可以进一步调节FAS-R-p55 TNF-R的相互作用。

抗p55-R的死亡区域的单克隆抗体特异性地抗TRADD和RIP位点的结合位置, 也可用于抑制或阻止这些蛋白质的结合, 因此导致FAS-R和p55-R的之间的相互作用的调节。

最近也发现除了上述所述的细胞细胞毒性和其通过各种受体介导的调节, 其结合蛋白质包括FAS-R, p55-R, MORT-1, TRADD, RIP, MACH, Mch4, 和G1, 许多这样的受体和其结

合蛋白质也参与核的转录因子NF- κ B的活性的调节，它是细胞生存或成活性的关键调节剂，负责许多免疫和炎症应答基因的控制表达。例如，已经发现TNF- α 实际上刺激NF- κ B的活性，因此TNF- α 能够在细胞中结合两类信号，一类激发细胞死亡和通过借助于NF- κ B诱导基因表达的保护抗死亡诱导的细胞的另一类(参见Beg和Baltimore, 1996; Wang等人, 1996; Van Antwerp等人, 1996)。也已经报道了对于FAS-R的类似的双重的作用(参见如在上述Van Antwerp等人, 1996所述的作用的参照)。因此显示基于TNF- α 和/或FAS-R配体的各种类型的细胞刺激之上，在细胞死亡和细胞存活之间存在有脆弱平衡，刺激的最终结果取决于细胞内哪方面被刺激到最大程度，一种情况导致死亡(通常由于程序化死亡)，另一种情况是通过NF- κ B的活性而存活。

另外，本发明人最近也进一步阐明了 TNF/NGF 受体家族成员激活 NF- κ B 的可能的途径(参见 Malinin 等人, 1997 和本文提出的各种最后的参照; 和共同拥有的正在审查的 Israel 专利申请第 IL 117800 和 IL 119133 号)。简单地说，它提出了 TNF/NGF 受体家族的几个成员通过共同的接合器蛋白质，TRAF2 能够激活 NF- κ B。称之为 NIK 的新阐明的蛋白质激酶(参见上述 Malinin 等人, 1997 和 IL 117800 和 IL 119133)能够结合到 TRAF2 和刺激 NF- κ B 活性。事实上，已经证明(参见前面所述的 Malinin 等人和 IL 申请)在激酶缺陷的 NIK 突变体细胞中的表达导致产生以正常的内源的方式不能刺激 NF- κ B 和也在通过 TNF 借助于 FAS-R 诱导 NF- κ B 活性的阻止，通过 TRADD, RIP 和 MORT-1 阻止 NF- κ B 的诱导(它是结合这些受体 p55-R 和/或 FAS-R 受体

的接合器蛋白质)。所有这些受体 p55-R, p75-R, FAS-R 和其接合器蛋白质 MORT-1, TRADD 和 RIP 直接或间接结合到 TRAF2, 根据其与 NIK 结合的能力显著调节 NF- κ B 的诱导。

在 FAS-R 和/或 p55-R 刺激之后, 在参与细胞死亡和生存之间的平衡的上述调节剂蛋白质中, 蛋白质 RIP 似乎具有重要的作用。RIP (参见 Stanger 等人, 1995 和也参见 Malinin 等人 1997) 在其 C 末端区域的死亡区域, 能够以独立的方式并且也通过与 MORT-1, p55-R, FAS-R 和 TRADD 的死亡区域的结合诱导细胞毒性。RIP 在其 N-末端区域和中间体区域也具有蛋白质激酶区域, 所述中间体区域据认为能够与 TRAF2 结合, 从而参与 NF- κ B 诱导。因此, 涉及 RIP 的特性和序列 (DNA 和氨基酸) 的详细资料列出在上述公开文献中 (特别是 Stanger 等人, 1995), 引入本文作为参考。

TNF 也是参与宿主抗病毒防御的启动和调节的细胞因子之一, 类似地, 已经将病毒发展为表达其蛋白质调节细胞因子活性的基因, 和这些调节细胞因子的病毒蛋白质据认为促进动物宿主内的病毒的存在, 这样的蛋白质的被研究得较透彻例子之一是来自于 C 组 2 和 5 型人腺病毒 (Ad) 的 E3-14.7K, 它具有 TNF-介导的细胞溶解性的强拮抗剂。

对于分离 TNF 的信号形成级联的分子成份的目的, 所述的成份借助于病毒感染靶击 E3-14.7K, 通过两种杂交筛选最近分离了人类 E3-14.7K 结合蛋白质 (对于 FIP-2 的 14K 相互作用蛋白质, Li, Y. 等人, 1998)。发现 FIP-2 对其自身免疫毒性, 并且逆转对 E3-14.7K 细胞毒性的保护性作用, 由 TNFR-I 或 RIP 的过量表达诱导的。发现 FIP-2 具有与 RAP-2 的一些同源性。RAP-2 和

FIP-2之间的总的相似形程度是相当低的，因为从两个氨基酸序列的共用排列看到的(图3)。但是在对着蛋白质的C-末端的特异性区域同源性变得更显著，最后的实际上的相同性是30C末端氨基酸。值得注意的是，除了上面提到的C-末端，FIP-2的推测的亮氨酸拉链基序在RAP-2中高度保守(不同的是Ile到Ala的替代)。

最近将编码涉及Huntington's疾病的蛋白质的称之为HYPL的类似序列在GenBank登记，主题为“Huntington相互作用蛋白质HYPL”(登记号AF049614)，所述的疾病似乎是与RAP-2远缘同源。但是，描述蛋白质的功能的文献还没有公开。

最近由Yamaoka S.等人(1998)公开的报道了鼠RAP-2同源性的鉴别。通过关键词的检索鉴别了鼠的同源NEMO(对于NF- κ B基本调节剂)，它调节NF- κ B信号形成的活化。对HTLV-I Tax-转化的大鼠成纤维细胞的细胞变体进行定性，命名为5R，它对所有测试的NF- κ B激活的刺激(LPS, PMA, IL-1, TNF)反应迟钝，并且执行其遗传互补作用。由于该程序，回收编码NEMO 48kD蛋白质的cDNA。基于该数据，据说SR细胞缺乏该蛋白质，并且它是高分子量I κ B-激酶复合物的一部分，并且是其体外形成所需要的，NEMO可能与IKK β 同源二聚体化并且直接相互作用。

以色列第120485号专利说明书公开了RIP-关联的蛋白质，称之为RAP，它特异性地结合到RIP并且抑制NF- κ B诱导。

以色列第123758号专利说明书和其涉及另一个称之为RAP-2的RIP相关的蛋白质，它具有相同或类似的活性。

根据本发明RAP-2也称之为303或RAP-303或RAT-303。对

于一贯性理由在此称之为RAP-2。

发明概述

本发明的目的之一是提供编码RAP-2蛋白质的DNA序列，其中RAP-2蛋白质能够结合到RIP，所述DNA序列包括下述之一：
(a)如图1所示的序列；(b)编码(a)中片段的序列；或(c)编码(a)或(b)的类似物的序列，该(a)或(b)的类似物与(a)或(b)的蛋白质相比在氨基酸序列中有不超过10个的变化，所述每一个变化为一个单独氨基酸的替代、去除和/或插入，所述片段或类似物能够结合到RIP。

本发明的目的之一是提供包括上述DNA序列的可复制的表达载体。

本发明的目的之一是提供新的蛋白质RAP-2，包括所有异型，其类似物片段或其衍生物能够结合到RIP蛋白质(下文称为‘RIP’)。因为RIP能够直接或间接与炎症，细胞的细胞毒性，细胞死亡的编码介导剂相互作用例如p55-R和FAS-R，以及接合器或调节剂蛋白质例如MORT-1，TRADD，

MACH，Mch4，G1和其它的相互作用，例如，通过结合到RIP本发明的新的蛋白质能够影响通过将FAS配体结合到其受体和TNF结合到其受体(p55-R)启动的胞内信号形成过程，并且本发明的新的蛋白质是p55-R和FAS-介导的对细胞的作用的调节剂。RIP也能够与TRAF2相互作用并且从而能够直接或间接与NIK的相互作用，这样RIP具有参与NF- κ B诱导的炎症和细胞存活途径的调节剂。同样，借助于FAS-R，p55-R和其调节蛋白质MORT-1和TRADD通过结合到RIP或结合到RIP激活的TRAF2可以直接或间接诱导NF- κ B和细胞存活，本发明的蛋白质也可以是借助于共同的或相关的胞内信号形成途径通过操作是细胞存活过程的介导剂，其中各种上述的蛋白质操作以诱导细胞存活。类似地，对于p75-R结合到与RIP结合的TRAF2，本发明的新的蛋白质也可以是RIP-相关的介导的p75-R介导的活性的调节剂。

本发明的另一个目的是对上述新的RAP-2蛋白质，其异型，类似物，片段提供衍生物拮抗物(例如抗体，肽，有机化合物，或甚至其异型)，该拮抗物可用于抑制信号形成过程，或更具体地说，如果需要包括炎性细胞细胞毒性，或细胞存活过程。

本发明的另一个目的是使用上述新的RAP-2蛋白质，其异型，类似物，片段和衍生物，以分离和定性另外的蛋白质或因子，它可能参与受体活性的调节，例如可结合到RAP-2蛋白质并且影响其活性的其它蛋白质和/或分离和鉴别新的蛋白质，其类似物，片段和衍生物结合到其上的在信号形成过程中上游或下游的其它受体，和因此它们也参与其功能。

本发明也提供了RAP-2结合蛋白质，它能够调节/介导RAP-2功能。

本发明还提供生产上述RAP-2蛋白质、其片段或功能类似物的方法。

本发明的又一目的是提供了能够导入到细胞与RAP-2和可能的RAP-2异型结合或相互作用的抑制剂，该抑制剂可以在细胞毒性过程中起抑制RIP-关联的活性的作用，因此，如果需要，以加强细胞存活，或具有在细胞存活过程中抑制RIP-关联的活性，因此如果需要，以加强细胞毒性。

而且，本发明的目的之一是使用上面提到的新的RAP-2蛋白质，其异型和类似物，片段和衍生物作为抗原片段以制备其多克隆抗体和/或单克隆抗体。该抗体依次可用于从不同的来源纯化新的蛋白质，例如细胞提取物或转化的细胞系。

此外，这些抗体可用于诊断目的，例如用于鉴别涉及由p55-R，FAS-R或其它相关的受体介导的异常功能的紊乱。

本发明的再一目的是提供了药物组合物，包括上述新的RAP-2蛋白质，其异型或类似物，片段或衍生物，以及包括上述抗体或其它拮抗剂的药物组合物。

根据本发明，已经分离了新的蛋白质RAP-2，RAP-2能够结合到RIP或与RIP相互作用，并且因此它是RIP胞内活性的调节剂或介导剂。RIP参与编码信号形成调节的调节或介导，例如细

胞毒性或细胞死亡相关的途径，其中RIP本身具有细胞毒性和因此许多其它的细胞死亡相关的蛋白质，例如MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1, p55-R和FAS-R直接或间接结合。例如RIP以直接或间接的方式借助于存在于RI片段“死亡区域”基序/模块和以所有前面所述的蛋白质结合到或与其相关；是炎症，细胞存活或成活性途径的另一条途径，其中RIP直接或间接借助于在RIP和RIP能够结合到与NIK结合的TRAF2的激酶基序或区域可能具有活化作用，依次它们直接参与NF- κ B的活化，其活化在炎性和细胞存活中起关键的作用。此外，p55-R能够与TRADD和TRAF2(借助于TRADD)相互作用并且也对NF- κ B的活化是重要的，从而在细胞存活途径中，并且因此通过与FAS-R, TRADD和 p55-R(借助于TRADD)以及TRAF2的结合或相互作用RIP也涉及通过这些蛋白质炎症的调节，细胞存活活化。因此，RIP是这些途径的调节剂或介导剂，并且类似地，通过结合到RIP本发明的新的RAP-2是这些胞内途径的调节剂或介导剂。

利用两种杂交系统已经分离和克隆了RAP-2，测序和定性，如下文所述的，RAP-2似乎是高度特异性RIP结合蛋白质并且因此特异性的RIP调节剂/介导剂RAP-2不与TRADD, MORT-1, p55-R, p75-R和MACH结合。进一步，似乎RAP-2不具有特征性的死亡区域模块或基序，该结果与RAP-2对其本身不诱导细胞毒性的结果不一致。

如本文使用的，RIP活性意味着包括在炎症和细胞死亡存活途径中的调节/介导。上文和下文以及上面提到的公开文献和专利文献中描述了这些活性，所有文献全文被引入作为参考。类似地，如本文使用的，RAP-2活性包括由于其与RIP的特异性结

合而形成的调节/介导RIP活性。由RAP-2调节/介导的RIP包括炎症，细胞死亡和细胞存活途径的调节/介导，如此RAP-2可以被视为以上提到的蛋白质或可能涉及炎症，细胞死亡和存活和RIP结合或以直接或间接方式相互作用的其它一些物质的间接调节者和介导者。

本发明也公开了能够利用全长RAP-2蛋白质序列作为饵由两个杂交筛选法鉴别的新的RAP-2结合蛋白质。

在两个杂交筛选法中应用全长RAP-2蛋白质作为饵，新的RAP-2相互作用蛋白质上文和下文表示克隆#10(或克隆#10-编码的蛋白质或RAT-结合蛋白质#10或RBP-10)。通过本领域内技术人员已知的共同的对5'末端的测序方法进一步延伸所获得的cDNA的序列，以重新构建失去了起始密码子的蛋白质的部分开放读框。

克隆#10的结合的全部项目的两种杂交测试表明该蛋白质不仅与RAP-2结合，而且也显示对TRAF2相当强的亲和性。但是克隆#10不与RIP，TRADD，MORT1，MACH，TNFR-1，TIP60和NIK以及几个控制蛋白质结合(例如lamin和cyclinD)但是胞内排除在哺乳动物细胞中发现的克隆#10与NIK的结合，考虑酵母中NIK行为的特性。证明克隆#10在后者的C-末端的200氨基酸内结合RAP-2，即与RAP，TIP60，NIK和IKK β 结合不必须的区域。但是不准确地该序列两个使我们执行几轮GenBank检索，目的在于鉴别克隆#10的同源性。已经显示与由克隆#10编码的蛋白质具有本质上的相似性程度的唯一的蛋白质是F40F12.5-来自于C. Elegans的推测的分子，其中没有指派生理学作用。

有趣的是，发现F40F12.5与普遍存在的蛋白酶的高度保守

家族的几个成员一些相似性。这些酶反过来平衡普遍存在的机理的破坏性作用，已经知道这种破坏作用在细胞中承担大多数蛋白质简并的事件。而到处存在的连接酶负责将多聚树状物结合到预定的蛋白质以进行降解，到处存在的蛋白质阻止生长的树状物的有效的分枝。基于与上面提到的到处存在的的相关蛋白酶的相似性对涉及F40F12.5功能的推测是有问题的，至今没有检测是否特定的蛋白质具有对到处存在的聚合体的酶促活性。此外一对观点不可能使得一致：

a)据信在到处存在的的蛋白酶的亚类中的catalytic区域在F40F12.5，和克隆10中是不保守的；

b)除了其催化位点，来源于到处存在的的蛋白酶家族的酶(从细菌到人)最终显示没有序列相似性，而F40F12.5和克隆10显示一定程度的同源性。

因此，似乎RAP-2是特异性的RIP-结合蛋白质并且因此RIP编码活性的调节剂/介导剂。根据其结合RAP-2的能力RAP-2结合蛋白质对RIP有间接的影响并且也是RIP胞内活性的调节剂/介导剂。

因此，由于RAP-2在调节/介导炎症，细胞存活和/或细胞上文活性明显具有作用，其中RIP直接或间接尤其是参与由各种刺激剂引起或诱导的哪些相关的细胞毒性和炎症，所述刺激剂包括借助于TNF/NGF受体家族和其它可能的受体转移的哪些(对于RIP参与胞内事件的方案和因此RAP-2参与，参见Malinin等人的图1，1997)。

RAP-2借助于以其它蛋白质的复合物的部分存在的例如RIP和结合到RIP的蛋白质也可用作为细胞毒性的抑制剂和炎症的抑

制剂，这样它可以影响这些其它蛋白质(例如p55-R，FAS-R，MACH，Mch4，G1和MORT-1)的细胞毒性或炎症的作用，最终导致其细胞毒性或对炎症的活性的抑制。

RAP-2也可以用作细胞毒性，炎症的加强子或增强子，并且通过增强其它蛋白质的活性，例如上文提到的RIP和结合到RIP的其它蛋白质，有助于通过RIP回收这些蛋白质，回收产物用于加强各种蛋白质的细胞毒性或加强其炎性作用。

类似地，本发明提供了编码RIP相关的蛋白质(RAP-2)，其异型，类似物或片段的DNA序列能够结合到RIP并且调节或介导RIP片段胞内活性，所述的胞内活性是炎性和/或细胞死亡和/或细胞存活的调节/介导。

特别是，本发明提供了选自于下列组的DNA序列：

(a)来源于天然的RAP-2蛋白质的编码区的cDNA序列；

(b)在中等严谨条件下能够与(a)的序列杂交的并且编码生物学活性的RAP-2蛋白质的DNA序列；和

(c)由于遗传密码简并为(a)和(b)中定义的DNA序列并且编码生物学活性RAP-2蛋白质的DNA序列。

本发明上文提到的DNA序列的另一个特异性实施方案是包括至少部分编码至少部分一个异型的RAP-2蛋白质的部分序列的DNA序列。上述DNA序列的另一个实施方案是编码RAP-2蛋白质的序列，如在图1中描绘的。还有另一个实施方案是显示于图2的DNA序列。

本发明提供了RAP-2蛋白质，和本发明所述的任何上述序列编码的其类似物，片段或衍生物，能够结合到RIP和调节/介导细胞死亡和/或细胞存活途径的生物学活性。

本发明的特异性实施方案是RAP-2蛋白质，其类似物，片段或其衍生物。如从图1和图2推测的RAP-2蛋白质序列显示于图3。另一个实施方案是任何RAP-2蛋白质的异型，其类似物，片段或衍生物。

本发明还提供了包括上述DNA的可重复表达的载体，这些可重复的表达载体能够在合适的真核或原核宿主细胞中表达载体；转化的真核或原核宿主细胞含有这样的可重复的表达载体；提供了在适合于所述蛋白质，类似物，片段号衍生物表达的条件下通过生长这样的转化宿主细胞生产本发明的RAP-2蛋白质，或其类似物，片段或衍生物的方法，实现所述的蛋白质的转译后修饰，如从所述的转化细胞的培养基或从所述的转化细胞的细胞提取物中获得所述的蛋白质和提取所述的表达蛋白质，类似物，片段或衍生物所需要的，上述定义结合用于包括RAP-2蛋白质的所有异型。

另一个方面，本发明还提供了特异性于RAP-2蛋白质的抗体或活性衍生物或片段，和本发明的类似物，片段和衍生物。

本发明还有另一个方面，提供了上述DNA或其编码的蛋白质的各种应用，根据本发明其应用包括如下所述：

(i)用于调节由蛋白质RIP调节或介导的胞内炎症，细胞死亡和/或细胞存活途径的调节的方法，包括以一个或多个能够结合到RAP-2蛋白质，其异型，类似物，片段或衍生物治疗所述的细胞，其中所述的细胞的治疗包括将所述的一个或多个蛋白质，其异型，类似物，片段或衍生物以适合于胞内导入的方式导入到所述的细胞，或以携带所述序列的合适的载体将一个或多个蛋白质，其异型，类似物，片段或衍生物导入到所述的细胞，

所述的载体能够以所述的序列在所述的细胞中表达的合适将所述的序列的插入在所述的细胞中有效起作用。

(ii)根据上述(i)所述，借助于RIP蛋白质的作用，用于调节基于对细胞的作用由TNF家族的配体介导的炎症，细胞死亡和/或细胞存活途径的方法，其中所述的细胞的治疗包括以适合于胞内导入的方式将所述的RAP-2蛋白质，异型，类似物，片段或衍生物导入到细胞内，或以适合于携带所述的序列的合适的载体的形式将编码所述的GI蛋白质，或异型，类似物，片段或衍生物的DNA序列导入到所述的细胞，所述的载体能够实现所述的序列以所述的序列在所述的细胞作表达的形式插入到所述的细胞。

(iii)在上述(ii)的方法中，其中通过以重组动物病毒载体转染上述的细胞而治疗所述的细胞，包括步骤：

(a)构建携带编码表达表面蛋白质(配体)的序列和表面选自于RAP-2蛋白质，异型，类似物，片段和衍生物的第二个序列的重组动物病毒载体，所述的表面蛋白质能够结合携带FAS-R和p55-R的细胞表面的特异性细胞表面受体，当在细胞中表达时，能够调节/介导胞内炎症，细胞死亡和/或细胞存活途径；
和

(b)以(a)所述的载体感染所述的细胞。

(iv)借助于RIP蛋白质的作用通过TNF家族的配体介导的用于调节炎症，细胞死亡和/或细胞存活的方法，包括以本发明的抗体或活性片段或其衍生物治疗所述的细胞，所述的治疗是将合适的组合物应用到所述的细胞，该组合物含有所述的抗体，活性片段或其衍生物，其中当至少部分RAP-2蛋白质与胞外表

面接触，所述的组合物配制为胞外应用，当所述的RAP-2蛋白质完全是胞内应用时，所述的组合物配制为胞内应用。

(v)借助于RIP蛋白质的作用通过TNF家族的配体介导的用于调节炎症，细胞死亡和/或细胞存活的方法，该方法包括以编码本发明的RAP-2蛋白质序列的至少部分的反义序列的寡聚核苷酸序列治疗所述的细胞，所述的寡聚核苷酸序列能够阻止RAP-2蛋白质的表达。

(vi)如上述(ii)用于治疗肿瘤细胞或HIV感染的细胞或其它疾病细胞的方法，包括：

(a)构建携带编码病毒表面蛋白质的序列和编码选自于本发明的RAP-2蛋白质，其类似物，片段和衍生物的蛋白质的序列的重组动物病毒载体，所述的表面蛋白质能够结合到特异性的肿瘤细胞表面受体或HIV感染的细胞表面受体或由其它疾病细胞携带的受体，当在所述的肿瘤中表达时，HIV感染的或其它疾病细胞能够通过RIP蛋白质的作用杀死所述的细胞；和

(b)用(a)的载体感染所述的肿瘤或HIV感染的细胞或其它疾病细胞。

(vii)借助于RIP蛋白质的作用通过TNF家族的配体介导的用于调节炎症，细胞死亡和/或细胞存活的方法，包括应用核酶步骤，其中将表面能够与编码本发明的RAP-2蛋白质的细胞mRNA序列相互作用的核酶序列的载体以在所述的细胞中允许所述的核酶序列表达的方式导入到所述的细胞，和其中所述的核酶序列在所述的细胞中表达，它与所述的细胞的mRNA序列相互作用并且裂解所述的mRNA序列导致所述的RAP-2蛋白质在所述的细胞中的表达被抑制。

(viii)从本发明的所述的方法中选出的方法，其中所述的RAP-2蛋白质编码序列至少包括本发明的能够结合RIP的RAP-2异型，其类似物，片段和衍生物。

(ix)分离和鉴别本发明的能够结合到RIP蛋白质的方法，包括应用酵母两个杂交程序，其中编码所述的RIP蛋白质的序列由一个杂交载体携带和来自于cDNA或基因组DNA文库的序列由第二个杂交载体携带，然后将载体用于转化酵母宿主细胞和分离的阳性转化细胞，随后通过提取所述的第二个杂交载体以获得编码结合到所述的RIP蛋白质上的蛋白质的序列。

(x)根据上述(i)-(x)任一项所述的方法，其中RAP-2蛋白质是RAP-2的异型，类似物，片段和衍生物之一。

(xi)根据上述(i)-(x)任一项所述的方法，其中RAP-2蛋白质或其任何的异型，类似物，片段或衍生物参与由其它介导剂或诱导剂介导的细胞的作用的调节，所述的RAP-2蛋白质，异型，类似物，片段或衍生物两个直接或间接结合到介导剂或诱导剂。

本发明也提供了用于调节炎症，借助于RIP蛋白质的作用TNF家族对细胞的作用或如上所述的任何其它介导剂或诱导剂对细胞的作用介导的细胞死亡和/或细胞存活途径的药物组合物，包括作为活性成份的任何下列之一：

(i)本发明的RAP-2蛋白质和生物学活性片段，类似物，衍生物的混合物；

(ii)编码能够结合细胞表面受体的蛋白质和编码本发明的RAP-2蛋白质或生物学活性片段或其类似物的重组动物病毒载体；

(iii)编码本发明的蛋白质下列的反义下列的寡聚核苷酸下

列，其中所述的寡聚核苷酸可能是上述(ii)的重组动物病毒载体的第二序列。

本发明还提供了：

I.用于炎症，由RIP蛋白质调节/介导的胞内细胞死亡和/或细胞成份途径的或其它介导剂或诱导剂，或其它NF- κ B诱导剂或抑制剂对细胞的作用的调节的方法，包括以RAP-2蛋白质，其异型，类似物或片段或以编码RAP-2蛋白质，异型，类似物或其片段的序列根据上述(i)-(x)的方法之一治疗所述的细胞，所述的治疗导致所述的RIP介导的作用的加强或抑制，从而也加强或抑制了FAS-R或p55-R-介导的作用，或所述的其它介导剂或诱导剂，或其它NF- κ B诱导剂或抑制剂的加强或抑制。

II.如上所述的方法，其中所述RAP-2蛋白质，类似物，片段或衍生物是RAP-2蛋白质的一部分，它特异性地参与结合到RIP，或所述的其它诱导剂或介导剂，或其它NF- κ B诱导剂或抑制剂，或所述的RAP-2蛋白质序列编码RAP-2蛋白质的一部分，它特异性地参与RIP的结合，或所述的其它介导剂或诱导剂其它NF- κ B诱导剂或抑制剂。

III.如上所述的方法，其中所述的RAP-2蛋白质是任何RAP-2异型之一，所述的异型能够加强RIP-相关的作用。

IV.如上所述的方法，其中所述的RAP-2蛋白质是任何RAP-2异型之一，所述的异型能够抑制RIP-相关的作用，或其它或其它介导剂或诱导对抗细胞的关联作用和从而也能够抑制对细胞的FAS-R-或p55-R-相关的作用，或其它细胞毒性介导剂或诱导剂对细胞的作用。

V.如上所述的方法，其中所述的RAP-2蛋白质，异型，类

似物，片段或衍生物能够借助于直接或间接抑制NF- κ B或直接或间接激活JNK或p38激酶加强或抑制对炎症和细胞存活途径。

可以采用用于分离和鉴别蛋白质任何标准的筛选技术例如酵母杂交方法，亲和层析方法和本领域内技术人员熟知的标准程序进行RAP-2蛋白质的分离，鉴定和定性。

在本发明的另一个方面，在酵母两个杂交筛选中将RAP-2蛋白质本身，或其异型，片段或衍生物作为饵使蛋白质结合其上。

结合到RAP-2，其异型，片段或衍生物的蛋白质也是本发明的一部分。

也以下面的详细描述的发明确提供了本发明的其它方面和实施方案。

应该注意到，在全文中使用的下列术语：“RIP，和FAS-配体，或TNF对细胞的作用的调节/介导”和任何其它的在说明书中提到的“调节/介导”被认为包括体外以及体内的治疗，另外也包括抑制或加强/增加。

附图简述

图1(A, B)(SEQ ID NO: 1)显示RAP-2的核苷酸序列，底下划线为起始和终止密码子。箭头指示由两个杂交筛选获得的1.5Kb克隆的起始；

图2(A, B)(SEQ ID NO: 2)显示克隆#41072(参见实施例1)的核苷酸序列，底下划线为起始和终止密码子。

图3A(/1, /2)显示人(20.4全长和人shrt)和鼠(NEMO全长和鼠部分)拼接RAP-2的变异体的推测的氨基酸序列和B(/1, /2)显

示利用在BCM Search Launcher(Baylor College of Medicine, Houston, TX)可获得的软件包装盒排列的FIP-2的公开的序列, 盒子中的是同源的氨基酸, 相同的氨基酸是灰色阴影。(B)中的星形表示FIP-2中的假设的亮氨酸-拉链(LZ)-类似的基序。

图4描述了RAP-2的分子特性。在人MTN印迹1(Clontech)与RAP-2的DNA片段的Northern印迹杂交中, 在B中如在实施例3详细描述的分析结合到RIP的RAP-2。在C中NIK-RAP-2的相互作用如在(B)中检测, 不同的是抗-FLAG抗体可用于Western印迹, 随后与抗-His6免疫测定。箭头表示免疫测定的蛋白质的位置。

图5是通过实施例4中描述的RAP-2的异位的表达, 由各种刺激激活的NF- κ B和c-Jun的被动下调的代表图。用报道质粒(对于NF- κ B(A)是HIVLTR-Luc或CMV-Luc, 对于c-Jun(B)活性测试是GAL4-Luc), 和对于指示的诱导剂的表达载体和空载体(在附图中仅仅标记为pcDNA3)或编码全长RAP-2的质粒(在附图中标记为pcRAP-2-)临时转染HEK-293T细胞, 表达基因萤虫素酶的活化以相对的萤虫素酶单位(R.L.U.)表示。

图6表示在宽的浓度范围内RAP-2对NF- κ B和c-Jun显示类似的抑制行为。TRAF2与各种指示的量的pcRAP-2(有义)或pcRAP-2-a/s(反义)构建体在HEK-293T细胞中临时表达。为了评价NF- κ B(A)和c-Jun(B)的激活, 分别诱导pHIVLTR-Luc和pGAL4-Luc报道质粒。实施例4的图5描述了萤虫素酶的测试。

图7显示RAP-2强力地加强信号诱导的c-Jun的磷酸化作用, 没有干扰JNK1/2的激活水平。

(A)采用Western印迹分析方法用实施例5描述的磷-Jun抗体鉴别以指示的表达构建体和附图中由负(-)表示的

pcDNA3-载体和附图中由加号(+)表示的pcRAP-2一起转染的HEK-293T细胞总的细胞裂解液,在较低的泳道上显示的对照膜用抗总的c-Jun Abs(NEB)预探测,

(B)以实施例5详细描述抗磷-JNK的Abs,对总的裂解液进行Western印迹分析,检测来自于以pcDNA3或pcRAP-2转染的和以hrTNF α 治疗以便增长时间的HEK-293T细胞的活化的JNK1/2。

(C)将HA-JNK1表达质粒与空载体,pcRAP-2和pcRIP各种组合共转染的HEK-293T细胞,借助于其N-末端HA-标签进行免疫测定,在体外激酶测试中测定细菌磷酸化纯化的GST-Jun的能力。通过SDS-PAGE分析反应产物。由箭头标记GST-Jun。

图8显示RAP-2不与NF- κ B和AP-1竞争结合到DNA。以单独的指示的蛋白质(-)或与pcRAP-2(+)一起转染HEK-293T。将从细胞制备的核提取物与³²P标记的寡聚核苷酸共培养,所述的寡聚核苷酸包括对AP-1(A)或NF- κ B(B)的经典的识别序列。通过非变性的PAGE分析反应产物。

图9显示RAP-2影响以可变量的RAP-2(有义)或RAP-2-反义(a/s)临时转染的HEK-293T和HeLa细胞的NF- κ B的基础水平。如实施例4的图6描述进行所有的操作。

图10(A, B)(SEQ ID NO: 3)显示克隆#10的部分核苷酸序列。

图11显示系列的缺失的RAP-2的功能特性。在A中,图示RAP-2的连续的C-末端缺失,所有的截断形式共享完整的RAP-2N-末端,而它们的C-末端由箭头表示。底下划线为RIP,NIK,IKK β 和TIP60结合区域。三个舱口方框与推测的亮氨酸-拉链类

似的基序对应。B显示利用NF- κ B的HIV-LTR萤虫素酶报道质粒，在A中描述的缺失构建体的过量表达对由RelA, TRAF2 TNF和NIK对HEK-293T细胞的NF- κ B活化的作用。报道基因萤虫素酶活性的激活以相对的萤虫素酶单位(R.L.U.)表示。

图12显示RAP-2功能和结合区域的物理结构图。

(A)测试各种缺失的RAP-2与转染的酵母(奇数列)和哺乳动物HEK-293T细胞(偶数列)中的指示的蛋白质的结合的能力。两个最右边的列显示在如实施例9描述的以高量将相同缺失转染到HEK-293T的能力，以抑制NF- κ B活化和启动对TNF- α 治疗应答的c-Jun高度磷酸化(c-Jun)。交叉的鲜明度与给定的作用的强度成比例。星形表示标记的构建体对Rel-A刺激的作用是不同的[参见图11(B)]。

(B)代表从缺失分析推断RAP-2的结合(上部)和功能性(底部)区域的位置显示于(A)，仅对蛋白质的骨架进行排列。舱口部分指示相应的基本区域的边界的可能的位置。

图13显示RAP-2的ser-148对于诱导ser-63的c-Jun高度磷酸化是必要的。

显示了Western印迹，其中wt是指野生型，S148A是指148位的ser被丙氨酸替代，和该载体是空的对照载体。

发明详述

一方面本发明涉及新的蛋白质RAP-2，它能够结合到RIP蛋白质，从而能够特异性介导或调节RIP的比例活性，而RIP参与上文详细描述炎症，细胞死亡和/或细胞存活途径的调节或介

导。因此RAP-2可以加强炎症，细胞死亡和/或细胞存活途径的RIP活性，或可以加强这些途径之一的RIP活性，而另一方面抑制它。

更具体地说，根据本发明，提供了新的蛋白质RAP-2。已经对RAP-2进行测序和定性，发现RAP-2是具有对RIP的高度特异性的RIP-结合蛋白质，但是没有显示与许多已知参与细胞内信号形成途径的蛋白质的结合，导致产生炎症，细胞死亡或细胞存活。RAP-2也明显与在这些途径中具有活性的蛋白质没有共同的区域，即RAP-2没有“死亡区域”基序或模块，它不具有激酶基序或区域并且不具有蛋白酶区域或基序。所测定的RAP-2序列也是独特的序列，如从与许多数据库包括Genebank，人基因组水平1，‘dbest’数据库中获得的序列比较。如上文详细描述(也参照所有出版物和如上所述的专利申请)RIP参与细胞内的炎症，细胞死亡和细胞存活途径。因此，RIP活性的调节或控制能够调节这些途径之一或所有的途径，当通过例如将TNF或Fas-配体结合到其受体时启动这样的途径(特别是TNF，p55-R)。RIP可以在测定该途径活化到最大程度起着关键的作用，借助于其结合许多具有死亡区域的细胞毒性的蛋白质的能力和也结合许多具有激酶活性的能力。因此本发明的蛋白质，例如特异性地结合到RIP的RAP-2蛋白质可能在调节RIP活性中起着重要的作用，从而与其它相比调节到诱导一个途径的程度。因此，本发明的RAP-2蛋白质代表重要的细胞内调节剂或介导剂。

除了本发明的RAP-2全长蛋白质，将较短的cDNA克隆，发现是由来源于几个远缘的“全长”cDNA区域的序列“阻塞”，

明显产生相同基因的拼接。通过研究ESTs集合鉴别人RAP-2的鼠的对应体。

进一步证实了转染的HEK-293T和HeLa细胞中RIP-RAP-2相互作用的生理学相关性。但是这样的复合物的形成不导致RIP酶促活性，如通过过量表达的RIP没有磷酸化RAP-2证明的。

在哺乳动物HEK-293T细胞中的转染实验也导致RAP-2-NIK复合物的稳定形成。

RAP-2似乎是NF- κ B和c-Jun信号转导途径的关键元件，由于它结合到NIK, IKK β 和TIP60(组蛋白酰基转移酶)和调节NF- κ B和c-Jun依赖性转录。事实上，加强的RAP-2异位的表达导致对NF- κ B应答的抑制，而借助于反义构建体从细胞中缺失导致加强的NF- κ B和c-Jun反式激活。

也发现RAP-2启动c-Jun高度磷酸化，没有被JNK的活性介导。RAP-2不抑制c-Jun和RelA结合到DNA。通过依次缺失分析鉴别了RAP-2的结合和功能性区域，这些研究已经指明RIP, NIK和TIP60的结合区域重叠并且发现在RAP-2的氨基酸95-264内。但是发现由RAP-2介导的下游功能作用以将蛋白质的N-末端区域包括氨基酸1-264定位。

根据上述RAP-2似乎是应力应答网络的信号减弱电路的决定性的元件：有义编码的构建体的异位的表达抑制应答，而反义编码构建体的表达加强应答。事实上，在发明人的实验室也已知RAP-2为RAT(减弱的RIP's)，并且因此在本文中认为是RAT和/或RAT-303和/或克隆303。

多个拼接变异体的存在指示至少部分在给定的条件下RAP-

2的最终的作用似乎取决于序列阻塞块的存在，它对于普遍的异型的蛋白质的结合/靶击/转导/修饰是必要的。例如如果将RAP-2结合到TIP60，允许前者的核的定位，假设具有拼接的核定位信号的(NLS)的RAP-2变异体可以是在NF- κ B/AP-1的抑制中缺陷或相反过度地活化。序列分析显示RAP-2携带已知的NLSs的大多数的阳性电荷的几个簇(E, K和R)特性。

已构建了结合到RIP的RAP-2的物理图谱到RAP-2区域。上述的蛋白质起始于177-218氨基酸和末端在264位。RAP-2内的RIP结合区域没有与IKK β 也没有与NIK结合位点重叠。

结合到TIP60，许多核蛋白质的家族称之为组蛋白酰基转移酶，明显该图谱在该区域横跨氨基酸95-264内。发现参与同源-二聚体的区域定位于氨基酸217-264之间。

累积的资料暗示所有的RAP-2的功能性作用(命名为NF- κ B的抑制和诱导c-Jun高度磷酸化)的图谱为相同区域。

由克隆# 10编码的蛋白质明显在氨基酸218-309之间起始的并且在氨基酸416位区域内结合，因此其结合位点可以包括与RIP, NIK, IKK β 和TIP60结合位点的重叠区域。

此外，由所有诱导剂足以有效地调节信号形成的区域定位到该蛋白质的N-末端区段。

由氨基酸95-416包括的区域有作用，虽然它明显较弱，与由全长蛋白质引起的情况的比较，因此由内源的RAP-2的加强的聚合产生的。

此外，除了RelA，在我们的实验中诱导的所有作用通过小至100个RAP-2的N-末端氨基酸介导的，事实上包括1-102个氨

基酸的片段介导不同的作用，尽管相当温和。

另一方面，RelA-介导的作用的抑制需要更长的部分的RAP-2。至今为止，我们定义了氨基酸1-264区域内的边界，它明显授与氨基酸157和264之间的区域具有一些特异性，RelA-相关的结合特性。

根据上面的观点，似乎：

a.除了RelA，RAP-2结合RIP，克隆#10和最有可能的NIK和TIP60对于该蛋白质的功能不需要，如过量表达诱导的NF- κ B的抑制剂。

b.显然RAP-2对RelA过量表达诱导的激活的作用至少部分被不同的结合事件介导，基本上，发现上面提到的蛋白质有助于给定的活性，如从目前进行的实验推测。

由于FAS-R和TNF受体引起死亡的独特的能力，以及TNF受体攻击各种其它组织损毁活性的能力，这些受体功能的异常对生物体特别有害。的确，已经证明这些受体的过量和缺陷功能有助于各种疾病的生理学表现。参与这些受体的信号形成活性的分子的鉴别和调节这些分子的功能的方式的发现，构成了对这些疾病的新的治疗途径的潜在的线索。考虑RIP在FAS-R和p55-R毒性中的疑存在的重要作用，因此借助于RIP的调节RAP-2对FAS-R和TNF疑存在重要的调节作用，设计可能在其中RAP-2有助于加强RIP介导的细胞毒性的条件下，借助于阻止RAP-2结合到RIP或抑制RAP-2和RIP之间的相互作用可以阻止RIP的毒性功能的药物(如上所述RIP对其本身和与具有死亡区域的其它蛋白质具有细胞毒性)。

同样，还已知(如上所述)FAS-R和p55-R参与NF- κ B的激活，并且从而参与细胞存活的激活。因此，当需要杀死细胞时，例如癌症细胞，HIV感染的细胞等，加强FAS-R和p55-R的细胞毒性作用是令人满意的(和它们相关的蛋白质例如MORT-1, MACH, Mch4, Gl, TRADD)，而在相同时间已知其诱导NF- κ B的能力。因此，当RAP-2与RIP相互作用或结合导致在加强NF- κ B的诱导中增强RIP的可能的作用(借助于TRAF2和借助于激酶区域和/或RIP的中间体区域)，然后阻止RAP-2和RIP之间的相互作用以抑制，或至少阻止NF- κ B激活的增强，从而转移TNF-或FAS-配体-诱导的作用与细胞毒性的侧面的平衡以最大程度地提供增加的细胞死亡。

类似地，对于相反的情况下(与上文提到的情况相反)，RAP-2与RIP的激活事实上导致对FAS-R和p55-R炎症或细胞毒性作用的抑制，例如抑制，各种自体免疫疾病等，当认为增加的细胞存活，然后设计加强RAP-2和RIP之间的相互作用以增强对细胞死亡的总体抑制和转移细胞存活之间的平衡。也根据上面提到的RAP-2's与RIP的相互作用导致在加强NF- κ B激活中的RIP's功能的抑制，然后当需要细胞存活时，阻止RAP-2和RIP的相互作用，从而加强NF- κ B激活中的RIP's活性是必要的。

考虑上文提到的，它产生了RIP在炎症，细胞死亡或细胞存活途径的诱导或介导之间的平衡具有关键的作用，因此RAP-2由于是RIP的调节剂具有同等的重要作用。利用上、下文提到的各种药物或治疗影响RAP-2-RIP相互作用/结合，可允许通过细胞内的信号传输途径将死细胞转移成活细胞，反之亦然。

本发明也涉及编码RAP-2蛋白质的DNA序列和由该DNA序列编码的RAP-2蛋白质。

此外，本发明进一步涉及编码RAP-2蛋白质的生物学活性类似物，片段和衍生物，其类似物和衍生物的DNA序列。参与标准技术可以制备这样的类似物，片段和衍生物(参见例如，Sambrook等人，1989)，其中可以缺失，叠加或由另一个密码子替代编码RAP-2蛋白质的DNA序列中的一个或多个密码子，以产生具有至少与天然蛋白质相比具有一个氨基酸残基变化。

可编的RAP-2蛋白质，异型，类似物，片段或衍生物的上述DNA序列包括能够与来源于天然的RAP-2蛋白质的编码区的cDNA杂交的DNA，其中这样的杂交是在适度地、严格地条件下进行的，和可杂交的DNA序列编码生物学活性的RAP-2蛋白质。因此这些杂交的DNA序列包括与天然的RAP-2 cDNA序列具有高度的同源性，代表了RAP-2类似的序列，例如可以是编码各种RAP-2异型的天然衍生的序列，或编码属于一组RAP-2类似的序列编码的具有RAP-2活性的蛋白质的天然存在序列。进一步，例如这些序列也可以包括非天然存在的，合成产生的序列，它们与天然的RAP-2 cDNA序列类似，但是包含许多需要的修饰。这样的合成序列包括所有可能的编码RAP-2的类似物、片段和衍生物的序列，所有这些均具有RAP-2活性。

为了获得上面所述的天然存在的RAP-2类似的序列，可以利用天然RAP-2 cDNA或其部分作为探针筛选和分离来自于各种组织的天然衍生DNA或RNA样品的标准程序(参见Sambrook等人，1989列出的标准程序)。

同样，为了制备上面提到的编码RAP-2的类似物，片段或衍生物的各种合成的RAP-2类似的序列，可以使用下文详细描述的有关于类似物、片段和衍生物的制备的许多标准程序。

“基本上对应于”RAP-2蛋白质的多肽或蛋白质不仅包括RAP-2蛋白质而且包括是RAP-2类似物的多肽或蛋白质。

基本上对应于RAP-2蛋白质的多肽是那些多肽，其中一个或多个RAP-2蛋白质的氨基酸已经被另一个氨基酸替代，去除和/或插入，条件是获得的蛋白质基本上显示与其对应的RAP-2蛋白质相同或有较高的生物学活性。

为了基本上对应于RAP-2蛋白质，通常RAP-2蛋白质的序列中的变化例如异型相对较少。虽然变化的量可以多于10，优选地不多于10个变化，更优选地不多于5个变化，最优选地不多于三个这样的变化，当将任何技术用于寻找基本上对应于RAP-2蛋白质的潜在的生物学活性蛋白质，一种这样的技术是应用在编码蛋白质DNA上的常规的诱变技术，导致产生几个修饰。筛选这样的克隆表达的蛋白质以结合到RIP上并调节如上所述的RIP对调节/介导胞内途径的活性的能力。

“保守的”变化是预期不会改变蛋白质的活性并且通常首先被筛选到的那些变化，因为预期这些变化不会基本上改变该蛋白质的大小、电荷或构型，因此预期不会改变其生物学特性。

RAP-2蛋白质的保守的替代包括类似物，其中多肽的至少一个氨基酸残基已经被一个不同的氨基酸保守地替代了。优选地根据下面在表IA列出的这样的替代，采用常规实验可以测定这样的替代以提供修饰的结构和功能特性的合成的多肽分子，而保持RAP-2的蛋白质的生物学活性。

表IA

原始的残基	典型的替代
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

或者，RAP-2蛋白质的另一组的替代是其中至少已经去除了多肽中的一个氨基酸残基并且根据下面的表IB在其位置插入不同的残基。在多肽中制备的替代的类型可以是基于不同的种的同源性蛋白质之间的氨基酸变化的频率的分析，例如Schulz等人，G.E.，蛋白质结构原则，Springer-Verlag，NewYork，NY，1798，和Creighton，T.E.的图3至图9：结构和分子特性，W.H.Freeman & Co.，San Francisco，CA 1983的表1-2中列出的那些。基于这样的分析，本文将另一种保守的替代定义为下面的5组之一内的交换：

表IB

- 1.小的脂肪族的，非极性的或稍微极性的残基：Ala，Ser，Thr(Pro，Gly)；
- 2.极性的带负电的残基和其氧化物：Asp，Asn，Glu，Gln；
- 3.极性的，带正电的残基：His，Arg，Lys；
- 4.大的脂肪族的非极性的残基：Met，Leu，Ile，Val(Cys)；和
- 5.大的芳香的残基：Phe，Tyr，Trp。

上述括号中的三个氨基酸残基在蛋白质的体系结构中具有特异性的作用。Gly是唯一的失去侧链的残基并且因此给予链灵活性。但是这趋向于促进第二结构的形成而不是 α -螺旋状的。由于其异常的几何结构，故可紧紧地夹住该链并且通常趋向于促进 β -圈-类似的结构，虽然在某些情况下Cys能够参与二硫键的形成，它对于蛋白质的折叠是重要的。注意上文Schulz等人

合并组1和2。还应该注意由于Tyr结合氢的潜力，故其与Ser和Thr等具有明显的家族关系。

本领域内技术人员已知例如上面所述的本发明的保守的氨基酸的替代，并且预期在氨基酸替代之后保持该多肽的生物学和结构上的特性。本发明的大多数的缺失和替代是那些在蛋白质或多肽分子中的特性没有产生基团的变化。将“特性”定义为以非排除性的方式改变第二结构，例如 α -螺旋或 β -片状的变化，以及在生物学活性中的变化，例如结合到RIP和/或RIP的介导对细胞死亡的影响。

在蛋白质中生产氨基酸替代的例子，在可用于获得本发明的RAP-2蛋白质的类似物，该方法的步骤是已知的，例如美国专利Mark等人的RE 33,653, 4,959,314, 4,588,585和4,737,462; Koths等人的5,116,943; Namen等人的4,965,195; Chong等人的4,879,111; 和Lee等人的5,017,691中列出的和美国第4,904,584号专利(Shaw等人)中列出的赖氨酸替代的蛋白质。

另外，上文讨论的保守替代不能明显改变RAP-2蛋白质的活性，无论是保守的替代还是较少的保守和更多的随机变化，都可导致RAP-2蛋白质的类似物的生物学活性增加。

当确认替代或缺失的准确效果时，本领域的技术人员将会认识到，通过常规的结合和细胞死亡测试可估算替代，缺失等的作用。利用这样的标准测试筛选不能涉及过多的实验。

可接受的RAP-2类似物是至少保留结合到RIP的能力的类似物，即，如上所述介导RIP在细胞内途径中的能力的类似物。以这样的方式，可以产生具有所谓的主要的负作用的类似物，称之为不能结合到RIP或在随后的信号形成或结合之后的其它活性

的缺陷。例如可以将这样的类似物用于抑制RIP的作用，或抑制NF- κ B对RIP的诱导(直接或间接)作用，这取决于这些活性是通过RAP-2和RIP的相互作用转换的(参见上文)，并且通过这样的类似物与天然的RAP-2与RIP的结合竞争。

在遗传水平上，这些类似物通常是通过在编码RAP-2蛋白质的DNA中的核苷酸的位点特异性诱变制备的，从而产生编码该类似物的DNA，并且之后合成DNA和在重组细胞培养物中表达多肽。通常该类似物显示与天然存在的蛋白质相同或增加的良好生物学活性，Ausubel等人，分子生物学目前的方案，Greene出版社和Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook等人，分子克隆：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，NY, 1989。

本发明的RAP-2蛋白质的制备，或编码相同多肽的交替的核苷酸序列，不同于天然的序列，因为遗传密码的已知的简并允许改变，本发明的序列可以通过编码较早制备的类似物或天然形式的RAP-2蛋白质的DNA的位点特异性诱变获得。位点特异性诱变允许通过利用编码需要的突变体的DNA序列的特异性的核苷酸序列，以及足够量的邻接的核苷酸制备该类似物，以提供足够大小的引物的序列并且序列的互补性，以在横断的缺失的交叉点的两侧形成稳定的双螺旋。通常，优选的引物长度为20到25个核苷酸，被改变的序列的各侧有5到10个互补的核苷酸。通常，位点特异性诱变是本领域内技术人员已知的，如Adelman等人，DNA 2:183(1983)出版物例举的，其公开的内容引入本文作为参考。

将会认识到，通常位点特异性诱变技术利用以单链和双链

形式存在的噬菌体载体。用于位点特异性诱变的典型的载体包括例如M13噬菌体载体，例如由Messing等人公开的，第三次Cleveland关于大分子和重组DNA的年会，编辑A. Walton, Elsevier, Amsterdam(1981)，其公开例如引入本文作为参考。这些噬菌体易于通过商业途径获得，通常其用途是本领域内技术人员已知的。或者，可以使用含有复制的单链噬菌体原点的质粒载体(Veira等人，酶学方法153:3, 1987)以获得单链DNA。

本文描述的位点特异性诱变通过下面所述获得：首先获得其序列内包括相关的多肽的DNA序列的单链载体。携带需要的突变的序列的寡聚核苷酸通过自动的DNA寡聚核苷酸合成制备。然后将这些引物用单链蛋白质-序列-含有序列的载体退火，并且与DNA聚合酶例如电传机聚合酶I Klenow片段接触，完成携带突变的链的合成。因此突变的序列和第二链携带需要的突变。然后将该异源双螺旋用于转化合适的细胞，例如大肠杆菌JM101细胞，和选择包括携带突变的序列的排列的重组载体：

在选择这样的克隆之后，可以去除突变的RAP-2蛋白质序列并且置于合适的载体，通常可用于转染合适的宿主的类型的转移或表达载体。

因此，使用已知的DNA或RNA扩增技术，例如PCR和化学寡聚核苷酸合成也可以体外和/或体内检测，获得和/或修饰编码RAP-2的蛋白质的基因或核苷酸。PCR允许由重复的DNA聚合酶反应扩增(数目增加)特异性的DNA序列。该反应可用作为克隆的替代；所有这些是了解核酸序列所需要的。为了实施PCR，设计与需要的序列互补的引物。然后通过自动的DNA合成产生该引物。由于可以设计引物以杂交到该基因的任何部分，

创造条件以便可以忍受互补碱基对的错配。这些错配的区域扩增导致诱变产物的合成，引起具有新的特性的肽的产生(即位点特异性诱变)。也参见Ausubel，见上文，第16章。也通过偶合互补的DNA(cDNA)的合成利用逆转录酶进行PCR，将RNA用作合成prolactin受体的胞外区域的合成的起始材料，没有克隆。

此外，设计PCR引物以掺入新的限制性位点或其它特性，例如在待扩增的基因片段末端的终止密码子。扩增的基因序列的5'和3'末端的限制性位点的替代允许编码RAP-2蛋白质或其片段的基因序列，习惯用于邻接载体中的其它序列和/或克隆位点。

PCR和RNA和/或DNA扩增的其它方法是本领域内技术人员已知的，并且基于本文的教导和指导可用于本发明，不需要过多的实验。DNA或RNA扩增的已知的方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)和相关的扩增过程(参见例如美国专利Mullis等人的4,683,195，4,683,202，4,800,159，4,965,188；Tabor等人的4,795,699和4,921,794；Innis的5,142,033；Wilson等人5,122,464；Innis等人5,091,310；Gyllensten等人的5,066,584；Gelfand等人的4,889,818；Silver等人的4,994,370；Biswas等人4,766,067；Ringold的4,656,134；PCR方案：方法和应用的指导)和利用靶序列的反义RNA作为双链DNA合成的模板进行RNA介导的扩增(Malek等人的美国第5,130,238号专利，商品名为NASBA)；和将DNA扩增的使用与抗体标记结合的贸易PCR[Ruzicka等人，科学260:487(1993)；Sano等人，科学258:120(1992)；Sano等人，生物技术9:1378(1991)]，所有的专利文献和出版物全部引入本文作为参考。

以类似的方式，参照如上所述的RAP-2蛋白质的类似物制备RAP-2蛋白质的生物学化学片段(例如任何的RAP-2或其异型)。RAP-2蛋白质的合适的片段是那些保留了RAP-2的能力并且可以调节或介导RIP的生物学活性或其它与RIP直接或间接相关的其它蛋白质，因此，参照如上所述的类似物，制备具有显性的负值或显性的正值的作用的RAP-2蛋白质片段。应该注意到这些片段代表特殊类型的本发明的类似物，称之为将它们定义为来源于全长RAP-2蛋白质序列的RAP-2蛋白质的部分(例如，来自于任何的RAP-2或其异型)，各个这样的部分或片段具有任何上面所述的需要的活性。这样的片段可以是肽。

类似地，采用对RAP-2蛋白质，其类似物或片段或通过结合RAP-2蛋白质，其类似物或片段到另一个或者分子例如抗体，酶，受体等如本领域内技术人员已知的一个或多个侧面基团的标准的修饰可以制备衍生物。因此采用本领域内技术人员已知的手段如本文使用的“衍生物”覆盖了可以从功能性基团制备的衍生物，这些基团存在于残基的侧链或C-末端或N-末端基团并且包括在本发明的范围内。该衍生物可以是化学成份例如碳水化合物或磷酸残基，条件是这样的组分具有与RAP-2蛋白质相同的或较高的生物学活性。

例如，衍生物可以包括羧基的脂肪族的酯，可以与氨或一级或二级胺反应的羧基的酰胺，与酰基成份形成的N-酰基衍生物或由酰基部分形成的氨基酸残基的游离的氨基(例如，alkanoyl后碳环的aroyl基团)或游离的羟基的O-酰基衍生物(例如丝氨酰或苏氨酰残基的那些)。

术语“衍生物”计划仅包括不会将一个氨基酸改变为20个

共同存在的天然氨基酸的那些衍生物。

RAP-2是蛋白质或多肽即氨基酸残基的序列。计划将构成较大序列的包括本文定义了整个RAP-2蛋白质的序列的多肽包括在这样的多肽的范围内，只要叠加不影响本发明的氨基酸的新特性，即，如果它们保留或增加RAP-2蛋白质的生物学活性或可以被例举以剩下具有RAP-2蛋白质的生物学活性的蛋白质或多肽。因此，例如计划将本发明包括具有其它的氨基酸或多肽的RAP-2蛋白质的融合蛋白质。

新的RAP-2蛋白质，其类似物，片段和其衍生物具有许多可能的应用，例如：

(i)在如上所述的炎症，细胞死亡或细胞存活中可以将RAP-2蛋白质，其类似物，片段和衍生物用于调节RIP的功能。例如，如果RAP-2可以调节RIP's对NF- κ B，JNK(Jun激酶)或p38激酶的活化的作用，当在抗肿瘤，抗或原炎症，抗HIV的应用是令人满意的，这样的RAP-2作用导致加强这样的RAP-2-RIP的作用。在某些情况下，采用本身已知的标准的程序可以将调节炎症，加强细胞毒性作用，或阻止细胞存活作用的RAP-2蛋白质，其类似物，片段或衍生物导入到细胞。例如，当RAP-2蛋白质完全是胞内(如怀疑)和仅仅应该导入到细胞中，而通过RIP介导的FAS-R配体或TNF或其它细胞毒性蛋白质的作用是令人满意的，用于将该蛋白质特异性导入到细胞的系统是必要的。一种方式是通过制备重组动物病毒，例如来源于牛痘的病毒，其中导入了下面的两个基因，编码结合到特异性地由该细胞表达的细胞表面蛋白质的配体的基因，例如AIDs(HIV)病毒蛋白质gp120，该蛋白质特异性地结合到某些细胞(CD4淋巴细胞和相关的白血

病), 或者特异性地结合到携带FAS-R或p55-R的细胞的其它配体, 所述细胞是携带FAS-R或p55-R的细胞; 和编码RAP-2蛋白质的基因。因此在病毒上表达的细胞表面结合蛋白质将会靶击特异性于肿瘤细胞或其它携带FAS-R-或p55-R的细胞的病毒, 在借助于病毒将RAP-2编码序列导入到细胞并且一旦在细胞中表达之后将会导致RIP介导的FAS-R配体或TNF作用或依赖性RIP的加强。采用标准的程序构建这样的重组动物病毒(参见例如Sambrook等人, 1989)。另一种可能是导入寡聚核苷酸形式的RAP-2蛋白质的序列(例如, 融合一种RAP-2或其异型), 所述的核苷酸可以通过细胞吸附并且表达。

(ii)可以将它们用于抑制由RIP介导的FAS-R配体或TNF或相关的蛋白质的作用或独立的RIP的作用, 例如, 在类似于在脓毒性的休克, 移植-对-宿主排斥, 或急性的肝炎中组织损害的情况下, 其中阻止FAS-R配体或TNF诱导的FAS-R或p55-R胞内信号形成或独立的RIP作用, 或其它蛋白质介导的信号形成和同时增加细胞存活途径是令人满意的。在这种情况下, 例如采用标准程序, 具有RAP-2蛋白质的反义编码序列的寡聚核苷酸导入到细胞中是可能, 这将有效地阻止编码RAP-2蛋白质的mRNAs的转译并且从而阻止其表达和导致对FAS-R配体-或TNF-或RIP或其它蛋白质的作用。利用上述重组病毒途径通过是寡聚核苷酸序列的病毒携带的第二序列可以将这样的寡聚核苷酸导入到细胞。

同样, 如上所述, 基于RAP-2-RIP相互作用的特性, 通过上述(i)和(ii)的方法, 加强或抑制细胞炎症和存活的途径是可能的。

另一个可能性是用于特异于RAP-2蛋白质的抗体以抑制细胞内信号形成活性。

最近研制的核酶方法是另一种抑制RIP介导的作用或RIP独立的作用。核酶是特异性地裂解RNAs的催化的RNA分子。可以将核酶进行基因工程以裂解选择的靶RNAs, 例如编码本发明的RAP-2蛋白质的mRNAs。这样的核酶具有特异性于RAP-2蛋白质mRNA的序列和通过裂解mRNA之后是有能力的或相互作用(互补结合), 导致RAP-2蛋白质的表达的降低, 根据靶细胞核酶表达的水平。为了将核酶导入到选择的细胞(例如, 携带FAS-R或p55-R的那些), 可以使用合适的载体, 例如, 质粒, 动物病毒(反录病毒)载体, 通常这些载体可用于该目的[也参见上面(i), 其中作为第二序列的病毒具有编码选择的核酶序列的cDNA]。(评论, 涉及核酶的方法等参见Chen等人, 1992; Zhao和Pick, 1993; Shore等人, 1993; Joseph和Burke, 1993; Shimayama, 1993; Cantor等人, 1993; Barinaga, 1993; Crisell等人, 1993和Koizumi等人, 1993)。该途径是合适的, 因为该RAP-2-RIP相互作用加强阻止细胞毒性或当RAP-2-RIP相互作用抑制NF- κ B活性是令人满意的情况, 在阻止该抑制以增加这样的NF- κ B激活是令人满意的, 即在增加上述(ii)中细胞存活是令人满意的相同情况下。

(iii)将RAP-2蛋白质, 其类似物, 片段或衍生物用于参与胞内信号形成过程的相同类别的其它蛋白质的分离, 鉴别和克隆, 即结合到RIP或结合到功能性相关的受体或蛋白质的那些, 在可以用于上面所述的酵母两个杂交系统的申请中或在PCR克隆之后可用于最近研制的使用非严格的Southern杂交的系统(Wilks等

人, 1989)。在Wilks等人的公开中, 描述了基于已知的激酶基序, 构思的激酶序列之后, 通过PCR克隆之后由非严格的Southern杂交的应用鉴别和克隆两个推测的蛋白质-酪氨酸激酶。该途径可用于根据本发明利用RAP-2蛋白质的序列用于鉴别和克隆这些相关的RIP结合的蛋白质。

(iv)将利用RAP-2蛋白质, 或其类似物, 片段或衍生物的另一途径用于亲和层析方法, 以分离和鉴别能够结合例如其它参与胞内信号形成过程的蛋白质或因子的其它蛋白质或因子。在该申请中, 可以将本发明的RAP-2蛋白质, 其类似物, 片段或衍生物单个结合到亲和层析基质, 然后引起与细胞提取物的接触, 或分离怀疑参与胞内信号形成过程的蛋白质或因子。在亲和层析程序之后, 可以洗脱, 分离和定性本发明的结合到RAP-2蛋白质或其类似物, 片段或衍生物或其它蛋白质或因子。

(v)如上所述, 也可以将RAP-2蛋白质, 其类似物, 片段或衍生物用作为免疫原(抗原)以生产特异性蛋白质。这些抗体也可用于从细胞提取物或从转化的产生RAP-2蛋白质, 其类似物或片段的细胞系统纯化RAP-2蛋白质(例如RAP-2或任何的异型)。此外, 这些抗体可用于诊断以鉴别涉及异常功能的RIP介导的FAS-R配体或TNF系统, 或独立的RIP活性, 例如通过RIP或RIP自身的特异性细胞作用介导的过活或低活的FAS-R配体或TNF-诱导的细胞作用的紊乱。因此, 这样的紊乱应该涉及参与RIP蛋白质或各种其它的, 如上所述的RIP-结合蛋白质或RAP-2蛋白质本身的多功能的胞内信号形成系统, 这样抗体作为重要的诊断工具。

应该注意到利用任何熟知的标准筛选程序进行本发明的

RAP-2 蛋白质的分离和鉴别和定性，例如，这些筛选程序之一，酵母两个杂交程序，如下文列出的，可用于鉴别 RIP 蛋白质(参见例如 Stanger 等人, 1995)和随后本发明的各种 RAP-2 蛋白质(除了上面和下面所述的共拥有的正在审查的专利申请的各种其它的新的蛋白质)。与如上文和下文所述的类似，可以将各种程序用于例如亲和层析，DNA 杂交程序等如本领域内技术人员已知的以分离、鉴别和定性的本发明的 RAP-2 蛋白质或以分离、鉴别和定性其它的蛋白质，因子，受体等，它能够结合到本发明的 RAP-2 蛋白质。

如上所述，可以将 RAP-2 蛋白质用于产生特异性于 RAP-2 蛋白质的抗体，例如 RAP-2 和其异型。因此可以使用这些抗体或片段，如下文详细列出的，应该明白这些申请中其抗体或片段是特异性于 RAP-2 蛋白质的那些。

基于本发明的分析：RAP-2 特异性地结合到 RIP 并且因此是 RIP 的介导剂/调节剂，因此以 RIP 独立或与其它蛋白质共同起作用的方式介导/调节在炎症、细胞死亡或细胞存活途径中的 RIP 的活性(例如在细胞死亡途径中的 FAS-R，p55-R，MORT-1，MACH，Mch4，GI 和 TRADD 或细胞存活途径中的 TRAF2)，设计可以加强或研制 RAP-2-RIP 的相互作用是重要的，如需要的，并且取决于这些途径是通过 RAP-2-RIP 相互作用加强、抑制的。这样的药物对许多疾病有帮助。对于其它，对肝有急性损失的急性肝炎似乎反映 FAS-R 配体介导的肝细胞的死亡；自体免疫诱导的细胞死亡例如胰腺的 β Langerhans 细胞的死亡，导致糖尿病；移植排斥的细胞的死亡(例如，肾，心脏和肝脏)；在多种硬化中大脑的少突神经胶质细胞的死亡。

RAP-2或一个或多个其可能的异型在一个或多个的上述途径用作为RIP的“天然”的抑制剂是可能的，和因此将它们用作为上面所述的RIP的特异性抑制剂。同样，也可以筛选其它物质例如肽，有机化合物，抗体等等以获得能够抑制RAP-2-RIP相互作用的特异性药物。

一个非-限制实施例是基于前人对ICE或ICE类似的蛋白酶的肽抑制剂和ICE的底物特异性和利用肽合成的表位分析，该实施例对RAP-2-RIP相互作用的肽抑制剂，是进行设计和筛选。发现通过ICE有效地裂解肽的最基本的要求设计四个氨基酸以留在在P1位置且具有对氨基酸的强力喜好，在P1位置具有足够的甲胺的裂解位点(Sleath等人，1990; Howard等人，1991; Thornberry等人，1992)。此外，the fluorogenic反应物肽(一种四肽)，乙酰-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-甲基-coumaryl-7-酰胺)缩写为Ac-DEVD-AMC，相当于聚poly(ADP-核糖)聚合酶(PARP)中的序列，发现在FAS-R刺激之后，以及其它的细胞死亡过程之后不久在细胞被分开(Kaufmann，1989; Kaufmann等人，1993; Lazebnik等人，1994)，和被CPP32(许多的CED3/ICE蛋白酶家族)和MACH蛋白酶有效地裂解(和同样地也可能例如GI蛋白酶，例如共同拥有的在审中的IL 120367)。

因为在底物的P1位置上的Asp似乎是重要的，具有作为第四氨基酸的残基的Asp和在最初的三个残基位置的四肽可以被快速地筛选以结合到蛋白酶的活性的位置，例如利用Geysen(Geysen，1985; Geysen等人，1987)研制的方法，其中对许多固体支撑物上的肽进行筛选以找到与抗体的特异的相互作用。通过多种本领域技术人员已知的检测方法，如GI蛋白酶

等可以探测结合MACHI蛋白酶到特异的肽。显示该Geysen's的方法能够在每个工作日测试至少4000个肽。

以类似的方式可以阐明决定RAP-2和RIP之间的相互作用精确的结合区域或同源性区域，然后肽可被筛选以用作阻滞相互作用，例如具有相似于结合区域或其互补的区域的顺序的合成肽，所述互补区域与天然的RAP-2竞争与RIP的结合。

可以将能够通过抑制RAP-2-RIP的相互作用而抑制RAP-2的炎症或细胞死亡活性的药物或肽抑制剂与促进进入细胞的分子结合或复合。

美国专利5,149,782公开待运输的分子穿过细胞膜偶合一个分子到膜混合剂如膜多肽，离子通道形成多肽，其它的膜多肽，长链脂肪的酸，例如棕榈酸。这些膜混合剂将分子的轭合物插入细胞的膜脂类双分子层和促进进入细胞质。

Low等人，美国专利5,108,921评论对于分子例如但不限于蛋白质，核酸通过受体调解的胞内活性的原理跨膜释放的有效的方法。这些受体系统包括识别半乳糖，甘露糖，甘露糖-6-磷酸盐，转铁蛋白，transcobalamin(维生素B12)， α -2大球蛋白，胰岛素和其它的肽生长因子例如表皮的生长因子(EGF)。Low等人教导由于在大多数的细胞的表面的生物素和叶酸盐受体的位置和多重性和关联的受体调解跨膜运输过程，营养的受体，例如生物素和叶酸盐的受体可有利地用于加强穿过细胞膜运输。因此在待释放进入细胞质的化合物和配体例如生物素或叶酸盐之间形成的络合物和携带生物素或叶酸盐受体接触开始受体调解的跨膜运输机理，从而允许想要的化合物进入细胞。

另外，本领域内技术人员已知将想要的肽顺序与前导/信号

肽序列融合以制备“嵌合肽”使得待运输的“嵌合肽”穿过细胞膜进入细胞质。

肽领域内技术人员将会认识到，本发明的RAP-2-RIP相互作用的肽抑制剂包括模拟肽药物或也可以快速筛选结合到RAP-2/RIP蛋白酶以设计更稳定的抑制剂。

也可以认识到将如上所述的用于有助于或加强肽抑制剂穿过细胞膜的运输用于RAP-2或其异型本身以及其它起胞内作用的肽和蛋白质。

就本文提到的抗体，术语“抗体”是指包括多克隆抗体，单克隆抗体(mAbs)，嵌合抗体，抗idiotypic(抗-Id)抗体，所述的抗体可以是可溶性的或以结合的方式进行标记，以及由任何技术但不限于酶促裂解，肽合成或重组技术提供的片段。

多克隆抗体是来源于以免疫原免疫接种的动物血清的抗体分子的异源群体。单克隆抗体含有特异性于抗原的抗体的基本上异源的群体，所述的群体基本上含有类似的表位结合位点。采用本领域内技术人员已知的方法抗原获得mAbs。参见，例如Kohler和Milstein，自然256:495-497(1975)；美国专利4,376,110；Ausubel等人，Harlow和Lane抗体：实验室手册，冷泉港实验室(1988)；和Colligan等人，目前的免疫学方案，Greene出版协会和Wiley Interscience N.Y.(1992-1996)，其所有内容引入本文作为参考。这样的抗体可以包括IgG，IgM，IgE，IgA，GILD的免疫球蛋白种类和其亚种。可以将产生本发明的mAb的杂交瘤在体外，原位或体内培养。体内或原位高效价的产生是目前有效的生产方法。

嵌合抗体是不同部分来源于不同的动物种类的分子，例如

具有来源于小鼠mAb的可变区和人免疫球蛋白不变区域。首先将嵌合抗体用于在应用中降低免疫原性和增加产量，例如，当鼠的mAbs从杂交瘤有较高产量，但是在人中有较高的免疫原性时，这样可以使用人/鼠的嵌合mAbs。用于生产的嵌合抗体和方法是本领域内技术人员已知的(Cabilly等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277(1984); Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984); Boulianne等人, 自然312:643-646(1984); Cabilly等人, 欧洲专利申请125023(公开日1984.11.14); Neuberger等人, 自然314:268-270(1985); Taniguchi等人, 欧洲专利申请171496(公开日1985.02.19); Morrison等人, 欧洲专利申请173494(公开日1986.03.05); Neuberger等人, 国际专利申请WO8601533, (公开日1986.03.13); Kudo等人, 欧洲专利申请184187(公开日1986.06.11); Sahagan等人, 免疫学杂志137: 1066-1074(1986); Robinson等人, 国际专利申请WO 8702671(公开日1987.05.07); Liu等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:3439-3443(1987); Sun等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:214-218(1987); Better等人, 科学240:1041-1043(1988); 和Harlow和Lane, 抗体: 实验室手册, 见上文。这些参考完全引入本文作为参照。

抗-idiotypic(抗-Id)抗体是识别通常与抗体的抗原结合位点关联的独特的决定族的抗体。通过免疫接种相同的种和遗传的类型的动物(例如小鼠株)作为正在制备的抗Id的mAb的来源制备Id抗体。通过生产对这些idiotypic决定族的抗体(抗-Id抗体)接种免疫的动物将会识别和响应免疫接种的抗体的决定族。参见美国专利4,699,880号, 该文献完全引入本文作为参考。

也将抗-Id抗体用作为“免疫原”以在另一个动物诱导免疫的应答，生产所谓的抗-抗-Id抗体。该抗-抗-Id其表位完全相同于诱导抗Id的原始的mAb。因此，通过利用抗mAb的idiotypic表位的抗体，识别表达同一的特异性的抗体的其它的克隆是可能的。

因此，产生抗本发明的RAP-2蛋白质，类似物，片段，衍生物的mAbs，可用于在合适的动物上，例如BALB/c老鼠中诱导抗-Id-抗体。将来自于免疫的老鼠的脾脏细胞用于生产抗杂交瘤分泌的抗-Id mAbs。此外，将抗-Id mAbs偶合到载体例如键孔血蓝蛋白(KLH)和用于免疫接种另外的BALB/c老鼠。从这些老鼠获得的血清含有抗-抗-Id抗体，该抗体有对上面的RAP-2蛋白质，类似物，片段，衍生物的表位特异的原始的mAb的结合属性。

因此抗-Id mAbs具有其自身的idiotypic表位或结构类似于待阐明的“idiotopes”表位，例如GRB蛋白质-a。

术语“抗体”也是指包括完整的分子以及其片段，例如Fab和F(ab')₂，它能够结合抗原。Fab和F(ab')₂片段缺乏完整的抗体的Fc片段，很明显可更快速地参与循环，和具有比完整的抗体更低的非特异的组织[Wahl等人，核酸方法杂志24:316-325(1983)]。

将会领会根据本文公开的用于完整的抗体分子的方法Fab和F(ab')₂和用于本发明的抗体其它的片段可用于检测和定量RAP-2蛋白质。使用酶例如木瓜蛋白酶(以生产Fab片段)或胃蛋白酶[以生产F(ab')₂片段]，通过蛋白水解作用的分裂典型的生产这样的片段。

据说抗体是一种“有能力的结合”的分子，如果有能力的特定地与该分子起反应从而结合该分子到抗体。术语“表位”是指有能力的与抗体结合的任何分子部分，该部分也能被那抗体识别，通常表位或抗原决定簇由分子的化学活性的表面分组，例如氨基酸或糖侧链和有特异的三维的结构特性以及特异的电荷特性。

“抗原”是指有能力的结合抗体的分子或部分分子，另外，它有能力的诱导动物生产有能力的结合到那个抗原的表位的抗体。抗原可以有一个或更多表位。上述的特异的反应是指示抗原将以高度选择性的方式与对应抗体和不与其它抗体的多数发生反应，该抗体由其它的抗原引起的。

将用于本发明的抗体，抗体片段用于在样品中定量或定性的探测RAP-2蛋白质或探测表达本发明的RAP-2蛋白质的细胞的存在。通过使用偶合到光显微镜的荧光标志的抗体免疫荧光技术，流动细胞计数器，或荧光计数器检出完成。

将本发明的抗体(或片段)从组织学的用作为免疫荧光法或免疫显微镜，以原位检出本发明的RAP-2蛋白质。通过从病人移动组织学的样品完成原位检出，和将本发明的标记的抗体提供给这样的样品。通过应用或通过将标志的抗体(或片段)覆盖到生物学的样品以更好地提供抗体。通过使用这样的程序，不仅测定RAP-2蛋白质的存在，而且其可分布在所检查的组织。本发明可使，本领域的技术人员容易理解普遍的种类的组织学的方法(例如染色程序)可以修饰以便在原位检测达到目的地。

典型的用于本发明的RAP-2蛋白质的测试包含在有能力的识别RAP-2蛋白质的标志的抗体存在下培养生物学的样品，例

如生物学的液体，组织提取液，新近收获的细胞例如淋巴细胞或白血球或已经在组织培养物中的培养的细胞，采用许多本领域已知的技术检测抗体。

用固体相支撑物或载体例如硝酸纤维素，或有能力的固定细胞，细胞粒子或可溶解的蛋白质的其它的固体支撑物处理生物学的样品。然后在用本发明的可检测标记的抗体处理之后用合适的缓冲剂洗涤支撑物或载体，如上所述。然后第二期用缓冲剂洗涤固体相支撑物或载体，以除去自由的抗体。然后采用常规的手段探测固体支撑物或载体的结合的标志的量。

“固体相支撑物”，“固体相载体”，“固体支撑物”，“固体载体”，“支撑物”或“载体”指有能力的结合抗原或抗体的支撑物或抗体。熟知的支撑物或载体包括玻璃，聚苯乙烯，聚丙烯，聚乙烯，葡聚糖，尼龙淀粉酶，天然的和修饰的纤维素，聚丙烯酰胺，辉长岩，和磁铁矿。载体的性能可以在少许的程度是可溶解的或对于本发明的目的是不能溶解的。支撑物材料可以事实上可具有任何可能的结构构型，只要偶合的分子有能力结合到抗原或抗体上。因此，支撑物或载体构型可以是球形的，如珠子，圆柱形的，如在管子的内部表面，或棒的外部表面。非此即彼，表面可以是平坦的例如片状的测试条状等等。首选的支撑物或载体包括聚苯乙烯珠。本领域内技术人员知道其它的合适的载体以结合抗体或抗原，或利用常规实验同样能够确定。

根据已知的方法可以测定如上所述的本发明的授予的许多抗体的结合活性。本领域内技术人员通过常规试验能明确各个试验和最佳的实施条件。

其它如洗涤，搅拌，振荡，过滤等步骤可以加到分析中，因为对于特定的情况是惯常的或必要的。

可检测地标记本发明抗体的方法之一是通过将其连接到酶和用于酶免疫测定(ELA)。顺次当以后暴露于适当的酶作用物，该酶将与反应物以这样的方式起反应以生产化学的一部分，该部分例如通过spectrophotometric, fluorometric或通过视觉的方法探测的化学的一部分。可用于可检测标志抗体的酶包括，但不限于苹果酸盐脱氢酶，核酸酶， δ -5-甾族化合物isomeras, 酵母乙醇脱氢酶，alpha甘油磷酸酯脱氢酶，丙糖磷酸盐异构酶，辣根过氧化物酶，碱性的磷酸酶，天冬酰胺酶，葡萄糖氧化酶， β 半乳糖苷酶，核糖核酸酶，脲酶，过氧化氢酶，葡萄糖-6-磷酸盐 dehydrogenase, 葡糖淀粉酶和 acetylcholin-酯酶。通过 colorimetric方法完成检测，该方法使用酶的产色的反应物。通过与类似制备的标准视力的比较反应物酶的反应的程度也可以实现检测。

使用多种其它的免疫测定实现检测。例如，采用放射性的标记的抗体或抗体片段，通过使用放射免疫测定法(RIA)探测 R-PTPase是可能的。在 Work, T.S.等人, North Holland Publishing Company, NY(1978)分子的生物学, 实验室工艺方法和生物化学中创立RIA的有益的描述, 特别的参照由 Chard, T., 的重要章节取名为“对放射性免疫鉴定和相关的技术”, 引入本文作为参照。采用类似使用计数器或现象闪烁计数字或放射自显影法的手段探测放射性的同位素。

用本发明的荧光的化合物标记抗体是可能的。当荧光标志的抗体与适当的波长的光接触时，然后探测出现的荧光。最多

通常使用的荧光标记的化合物是荧光素异硫氰酸盐，硷性蕊香红，phycoerythrin, pycocyanin, 别藻蓝蛋白, o-phthaldehyde 和荧光胺。

使用放射荧光的金属例如¹⁵²E, 其它的lanthanide系列也可检测地标记。使用这样的金属整合剂团如二乙稀三胺pentaacetic acid(ETPA)将这些金属附加到抗体。

通过偶合到化学发光化合物也可以对抗体可检测地标记。通过检测化学发光的存在, 测定化学发光标记的抗体的存在。该化学发光是在化学的反应过程出现的。特别可使用的化学发光标记的化合物的例子是luminol, isoluminol, theromatic acridinium酯, 咪唑, acridinium盐和草酸盐酯。

类似地, 可将生物性发光化合物用于标记本发明的抗体。生物发光是建立在生物学的系统中的化学发光类型, 其中催化的蛋白质增加化学发光反应的效率。通过检测发光的存在测定生物发光蛋白质的存在。重要的生物发光化合物是荧光素, 虫萤光素酶, 虫萤光素酶和aequorin。

本发明的抗体分子可适应用于immunometric鉴定中, 也已知“二个位置”或“夹心”分析。在典型的immunometric分析, 将定量的未标记的抗体(或抗体的片段)结合到固体支撑物或载体上, 定量的可检测的标记的可溶解的抗体加入以允许固体相抗体, 抗原, 和标记的抗体之间形成的三态的络合物检测和/或quantitation。

典型的和首选的immunometric测定包括“向前的”测定, 其中首先将结合到固体相的抗体与待经验定的样品接触, 通过形成二态的固体相抗体-抗原络合物以从样品提取抗原。在合适

的孵育之后，洗涤固体支撑物或载体以除去液体样品的残渣，包括未反应的抗原，如果需要，然后与含有未知量的标记的抗体(功能为“受体分子”)的溶液接触，在第二孵育期之后，通过未标记的抗体许可标记的抗体与结合到固体支撑物或载体的抗原复合，将固体支撑物或载体洗涤第二次以除去未反应的标记的抗体。

使用再一的“夹心”测定类型，可与本发明的抗原一起使用，所谓的“同时发生的”和“逆转”测定。同时发生的测定包括单一的孵育步骤，例如将结合到固体支撑物或载体和标记的抗体同时加入到待经验定的样品。在孵育完成之后，将固体支撑物或载体洗涤以除去液体样品的残渣和未复合的标记的抗体。然后测定标记的与固体支撑物或载体关联的抗体的存在，因为它是在常规的“向前”夹心测定。

在“逆转”测定中，在合适的孵育时期之后，利用首先逐步将标记的抗体的溶液加入到液体样品，随后加入结合到固体支撑物或载体的未标记的抗体。在第二孵育之后，以常规的方式洗涤固体相使样品的残基和未反应的标记的抗体自由。然后入“同时”和“向前”测试，测定与固体支撑物或载体关联的标记的抗体。

采用标准的重组DNA程序生产本发明的(参见例如，Sambrook等人，1989和Ansabel等人，1987-1995，见上文)，其中通过适当的含有编码蛋白质的真核或原核载体转化本领域内技术人员已知的合适的真核或原核细胞，因此，本发明还涉及这样的表达载体和用于生产本发明的蛋白质的转化宿主。如上所述，这些蛋白质也包括生物学活性的类似物，片段和衍生物，

因此包括编码它们的载体，也包括编码这些蛋白质的类似物和片段，和转化宿主包括生产这样的类似物和片段的宿主，由转化宿主产生的这些蛋白质的衍生物是采用蛋白质或类似物或片段的修饰标准本修饰生产的衍生物。

本发明还涉及包含编码RAP-2蛋白质的重组动物病毒载体的药物组合物，该载体也编码有能力的结合到特异的靶细胞(例如，癌细胞)表面蛋白质以指导RAP-2蛋白质序列进入细胞的病毒表面蛋白质。此外本发明的药物组合物包含(a)作为活性的成份的编码RAP-2蛋白质序列的反义序列寡核苷酸序列，或(b)阻滞RAP-2-RIP相互作用的药物。

本发明的药物组合物包括足够量的活性成份以获得其计划的目的。另外，引物组合物可以含有合适的药理学可接受的载体，该载体包括赋形剂和助剂，这有助于活性化合物加工成为可在药理学上使用的制剂，并且可以使这样的制剂稳定可用于给需要的患者给药，如本领域内技术人员已知的技术。

令人怀疑的是RAP-2蛋白质和其异型或异型是以表达参与共同拥有的正在审查的专利申请所述的胞内信号形成途径的各种其它蛋白质的表达类似的方式，以显著的不同的水平在不同的组织中表达并且明显具有不同的异型方式。这些不同可以有助于对Fas/APO1-配体和TNF应答的组织特异性特征。如其它的CED3/ICE同源性的情况(Wang等人, 1994; Alnemri等人, 1995), 本发明人以前已经证明(在上述国际专利申请)发现含有不完整的CED3/ICE区域(例如MACH α 3)的MACH异型对共表达的具有MACH α 1或MACH α 2分子具有抑制作用; 还发现它们通过Fas/APO1和p55-R阻止死亡的诱导。这样的异型中细胞中的表达

构成了抗Fas/APOI-和TNF-介导的细胞毒性的细胞自身保护作用，还令人怀疑的至少GI异型的类似的抑制这样(GI是最近分离的新的Mch4-和可能的MACH-结合蛋白质，该蛋白质具有MORT调节剂和蛋白酶区域-参见共同拥有的正在审查的IL 120367)。MACH异型的各种不均匀性并且同样令人怀疑GI异型的类似的应该允许活性MACH异型的功能的特定的精细协调，并且类似物也允许活性GI异型，其中不均匀性大大超过其它CED3/ICE家族所观察到的结果。因此，如上所述，就与RIP的相互作用并且从而对细胞死亡的激活或细胞存活途径之间的平衡的作用，如上所述而言RAP-2蛋白质或可能的异型在不同的组织中具有不同的作用。

一些RAP-2异型也可能具有其它的功能。例如，RAP-2或一些RAP-2异型也可能具有分子的位点的作用，所述的分子借助于与RIP的相互作用或单独的RIP的作用参与Fas/APOI和TNF受体的非细胞毒性作用。

由于Fas/APOI和TNF受体引起炎症，细胞死亡的独特的能力，以及TNF受体激发其它组织损毁活性的能力，这些受体功能的偏离应该对生物体特别有害。的确，已经证明这些受体的过量的和有效的功能有助于各种疾病的病理学的表现(Vassalli, 1992; Nagata和Golstein, 1995)。鉴别参与受体的信号形成活性的分子和发现调节这些化合物的发现的方式可以指导新的治疗途径，本发明的其它方面从下面的实施例是显而易见的。

下面的非限制性实施例和附图将更详细地描述本发明。

还应该注意下面的步骤：

i)两个杂交筛选和两个杂交 β -半乳糖苷酶表达测试；(ii)诱导蛋白质的表达，代谢标记和免疫沉淀；(iii)体外结合；(iv)评价细胞毒性；和(v)Northern序列分析，(参见Boldin等人，1995b)2, 3(也参见Boldin等人，1996)和4，下文，就MORT-1和a MORT-1结合蛋白质，(例如MACH)，以及新分离的蛋白质GI(参见IL 120367)同样可用于(有一些修改)RAP-2蛋白质的对应的分离，克隆和定性，和本发明的克隆的异型。因此这些程序构成了用于分离本发明的RAP-2蛋白质的分离，克隆个定性的相同程序的全部公开，如在共同拥有的正在审查的以色列申请第114,615, 114,986, 115,319, 116588, 117,932, 和120367, 以及相应的PCT申请US96/10521的相同或等同方式详细描述。从外，就NIK蛋白质和其在激活NF- κ B和因此细胞死亡的作用和由TRAF2该细胞存活途径中所起的作用例如TRAF2和RIP和其它蛋白质之间的相互作用，通过本发明人在共同拥有的正在审查的IL 117800, IL 119133和Malinin等人，1997详细描述的。

实施例1 结合到RIP蛋白质的RAP-2蛋白质的分离和克隆 两个杂交筛选，测序和初步的分析

在B细胞文库这利用以RIP作为饵的两个杂交筛选方法(参见例如Fields和Song, 1989, WO/96/18641)分离约1.5Kb大小的克隆，该克隆1.5Kb(参见图1和图2的箭头)用于筛选噬菌体cDNA文库，产生约2.0Kb克隆，序列显示于图1。

通过使用与1.5Kb克隆序列匹配的EST，获得EST片段，它构成了I.M.A.G.E.consortium克隆#41072的3'末端(研究遗传

院 Research Genetics Institute)。仅公开了该来源于胎儿的脑的文库的克隆的位于 3'和 5'末端的两个小序列片段。在获得克隆之后，将其测序并且得出这些公开的序列片段含有错误。发现测序的克隆在其编码区(图 2)等同于图 1 的克隆，但是在 5'非编码区显示差异。因此推测 cDNA 或者是相同基因的拼接的形式。

该序列分析显示类似于RAP，RAP-2蛋白质明显不具有“死亡区域”，它没有MORT调节剂，它没有类似于蛋白酶区域的ICE家族，它没有激酶区域，也没有TRAF区域(参见上述正在审查的专利申请，和各种的参考，就所有的存在于胞内的发信号途径而言尤其是Malinin等人，1997)。没有发现相当的基序存在于约定的序列，不同的是三个亮氨酸拉链(LZ)-类似的障碍沿蛋白质编码区域分布。这里称为“类似”，因为它们的二个包含亮氨酸到缬氨酸，甲硫氨酸或者异亮氨酸的替换。虽然通常认为保守的，但是不清楚是否在亮氨酸拉链区域内的这样的变化允许蛋白质保留它的功能的活性即结合到其它的LZ。结合研究显示RAP-2本质上结合到RIP，RAP-2，不能结合到TRADD，MORT-1，p55-R，p75-R和MACH(至今进行的研究中)。这些结果支持事实RAP-2明显去除“死亡区域”和MORT调节剂。

因此，似乎RAP-2是特异性的RIP-结合蛋白质，该蛋白质以非常特异性的方式作用/结合到RIP。因此，RAP-2似乎是在炎症和细胞死亡/细胞存活率途径的RIP的调节/介导中具有重要的作用。

简单地说，通过利用全长RIP作为饵进行两个杂交筛选的人B-细胞的cDNA文库获得RAP-2的克隆。RIP序列可以从以前的出版物获得(参见STANGER等人，1995)和存在于GenBank数据

库的登记号为U25994,它是人RIP序列(也存在小鼠RIP序列,登记号为U25995)。利用该序列信息,合适的PCR-引物用OLIGO4™软件设计和对应于RIP编码部分的DNA片段可以通过利用来自于总的RNA人成纤维细胞文库(利用标准程序)用作为模板cDNA进行PCR获得。然后将RIP的编码部分克隆到pGBT-9的载体(Clontech)和如上,在两个杂交筛选程序用作为饵。在两个杂交筛选方法中,获得与RIP相互作用的编码RIP结合蛋白质。

将如上的克隆用于筛选噬菌体cDNA文库和EST数据库。从图1和图2可以看出,当5'-非编码序列不同时,两个克隆的编码序列是相同的。因此,我们可能关心可选择大拼接形式。该克隆的具有ORF(开放读框)为1.5Kb的2.0Kb,蛋白质本身的分子量为50Kd。推测的RAP-2的氨基酸序列显示于图3。

在“dbest”数据库,人基因组数据库level 1和GenBank数据库分析上述RAP-2的序列显示RAP-2序列是独特的(新的)序列,因为没有已知的序列显示与RAP-2重要的同源性。在IL 123758递交之后,该申请要求的优先权,Yamaoka S.等人(1998),报告编码48kD的蛋白质的鼠的cDNA的特性,称之为NEMO(对于NF- κ B必要的调节剂)。(参见背景资料)。

另外的数据库(in silico)检索识别FIP-2-具有未知功能的蛋白质,它最初由Li Y.等人克隆(1998,参见背景资料)。

如从RAP-2和FIP-2序列的通用的排列可以看出[图3(B)],全部的类似的程度是相当地低(因此它没有令人惊讶:使用基于共用算法进行扫描没有识别该序列)。RAP-2和FIP-2之间的同源性增加蛋白质的C-末端的,最后有效的标识C-末端的30个氨基酸。值得注意的是,除了后者的区域,FIP-2的推定的LZ-基序在RAP-2

中是大量地保留的(不同的是亮氨酸/丙氨酸替换)。

另外的大约0.5kb的较短的cDNA也被识别(ID:1469996)和下文将它指定为Human shrt。该变异体包含起源于1.5kb的“全长的”cDNA的几个遥远的区域的编码序列“区段”，可能起源相同的基因的不同剪接。

许多的组织的Northern印迹(Clontech)与0.9kb BglII-片段的RAP-2 cDNA, 的杂交分析得出复杂的图案的RAP-2 mRNA。以或多或少的普遍存在的流行的2.5kb和6kb变异体[图4(A)]探测大小范围在<1kb up to>7kb的至少5个不同的mRNAs。

实施例2 鼠的RAP-2的鉴别

在TIGR建立的鼠EST收集品的相似的研究显示1.6kb(鼠部分ID:761011, 图3)部分的cDNA可能对应小鼠RAP-2, 因为事实上自始至终编码区域同等于(95%)其人的相应物(参见图3)。

然而人和鼠的RAP-2和NEMO序列之间的不同延伸更远处, 这可以明确地归功于有规则的种中间的不同。事实上, 与全长人的变异体相比和与部分的鼠的序列相比来自鼠的RAP-2和NEMO序列的在20.4的249位置7个氨基酸的缺少的区段和在NEMO开放的阅读框的3氨基酸的插入物(在位置111的KLE)仅是最多的显著的实施例(图3)。然而这致使蛋白质的活性功能消退。事实上报道的NEMO的功能属性显示人RAP-2中发现的情况相反, 虽然对NEMO的分级分析证实它定位于signalsome。

实施例3 哺乳动物细胞中RIP结合到RAP-2

在转染的HEK-293T和HeLa细胞获得RAP-2-RIP相互作用的

生理学的关联的进一步的证据。的确，如下面图4B的各个泳道指示的来自转染的HEK-293(ATCC No.CRL 1573)细胞的溶菌产物轻易地共沉淀和与抗-FLAG mAbs(Kodak)免疫沉淀这二个蛋白质。然后采用常规的Western印迹程序，用抗-His6 mAbs(Sigma)分析免疫复合物中组氨酸-RAP-2的存在[图4(B)和数据未显示]。然而，这样的复合物的形成没有致使酶的活性：到我们通过体外复合物激酶测定可以判断的程度，过量表达的RIP没有磷酸化RAP-2(未显示)。

进行结合分析测试以测定是否RAP-2结合到任何其它的已知的胞内信号形成蛋白质。在这些测试中对蛋白质TRADD), MORT-1, p55-R, p75-R, MACH结合到RAP-2的能力进行测试。但是，发现RAP-2不能结合到这些蛋白质。RAP-2也没有结合到任何的对照蛋白质例如lamin, cyclin D。

因此所有上述的结果显示新的RAP-2蛋白质可能以非常特异的方式互相影响和同样地代表RIP的特异的调节剂/调解剂。

实施例4 RAP-2与NIK的互相影响和控制NF- κ B和c-Jun-依赖性转录

尽管在显示稳定的形成该络合物的酵母转染的试验的HEK-293T哺乳动物细胞的二个杂交测试中没有发现RAP-2-NIK的相互作用。如实施例3描述探测NIK-RAP-2相互作用，只是将抗-FLAG抗体用于Western，接着以抗-His6免疫沉淀[图4(C)]。酵母和哺乳动物细胞之间的这样的差异不是令人惊讶的，当在酵母中表达，全长NIK易于放任结合属性。

考虑事实相信RIP和NIK体内是TNF-诱导NF- κ B的活化的不可缺少的调节剂。我们检查是否在细胞培养物中RAP-2的过量表达不能干涉特定的发信号途径。在以报告者质粒短暂的转染的HEK-293T细胞中进行开始的实验组,所述的质粒包含HIV-LTR基本启动子控制下的萤虫素酶基因。在类似的设置,最初建立RAP-2下调,几乎后退到基本的水平,由各种的已知的NF- κ B诱导物涉及TNF的发信号(NIK, TRAF2, RIP等)的过量表达引起的报告者的活化和外部刺激[TNF和PMA, 图5(A)]对细胞的处理。以报道质粒(对于NF- κ B(5A)为HIVLTR-LUC或CMV-LUC,对于c-Jun(5B)激活实验为GAL4-LUC),以对于所述的诱导剂的表达质粒和空质粒(pcDNA3)或编码全长RAP-2的质粒(pcRAP-2)临时转染HEK-293T细胞。很明显,事实是:RAP-2能够发挥其作用,直到下降信号转导途径,能暗示该蛋白质的部分的作用对各种,和分散的,信号形成途径是共同的(参见上文)。同时,荧光酶的 κ B-独立转录(CMA早期启动的启动子)不是矛盾的[图5(A)],因此我们相信可以控制由RAP-2的基本的转录/翻译机理的可能的重排。这些结果随后在HeLa细胞中被证实(未显示)。

但是,如进一步的效价滴定分析显示的,实际的现象更复杂,事实上,以各种量的pcRAP-2显示于图6,TRAF2临时在HEK-293T细胞中的表达,在低浓度(大约20纳克/10⁶细胞)时RAP-2急剧改变其行为,加强TRAF2 NF- κ B诱导的转录[参见图6(A)]。但是,通过以相反的方向代替原始的插入物,命名为RAP-2反义表达的载体,以各种不同量的pcRAP-2-a/s(反义)构建体

TRAF2被临时地在HEK-293T细胞中表达，分析RAP-2的逐渐缺失的效果，导致做出浓度相关的图。斜率的总的趋势指示细胞的应答大略与转染的RAP-2 DNA的量成反比，不同的是特性区域落在对应于该蛋白质的内源性水平的“零”-点(图6)。应该注意到通过导入反义下调给定的基因的表达是更精确的，如与有义的过量表达相反。事实上，反义不参与细胞内外来蛋白质的人工生产，因此，清楚地对RAP-2抑制的能力的有效性在底下划线。然而，应该注意到上述的急变以低的浓度反映出，非倒转地，图表的反意的一半(图6)。

为了估价转录系统的多样性，其中涉及RAP-2，我们改变为研究c-Jun，一种核的因子，证明其在建立和维护适当的紧迫应答的作用几乎与NF- κ B同样重要的。利用商品化的“途径探测”系统(Stratgene)的成份，在HEK-293T和HeLa细胞[参见图5(B)和图6(B)]我们证实与几个的认可的AP-1的活化剂相关的相似的二方面行为。

实施例5 RAP-2加强c-Jun超磷酸化，没有改变JNK活性

为了研究对转录具有深刻的作用的机理，测定正常的发信号破碎的精确的水平是必要的。公认的c-Jun反式活化可能性是通过其氨基的末端的活化区域的二个丝氨酸残基(^{63}Ser & ^{73}Ser)的胞外信号诱导的磷酸化作用调节的。负责上面提到的磷酸化作用的JNK/SAPK蛋白质激酶构成MAP激酶族的远的子集，和其本身经由进一步的向上游双重的特异性特异性激酶介导的激酶在 ^{183}Thr 和 ^{185}Tyr 磷酸化作用激活。因此，可以将c-Jun和JNKs内

的适当的位置的磷酸化作用用作为反射蛋白质的激活状态的标记。Western印迹分析以短暂的转染的HEK-293T细胞的溶菌产物显示，虽然c-Jun-介导的转录的削弱，RAP-2显著地加强内源的c-Jun在⁶³Ser由许多刺激物诱导的磷酸化[见图7(A)]。以指示的表达构成物于与pcDNA3-载体一起转染的HEK-293T细胞的总的细胞的溶菌产物由图7表示，由负号(-)或在相同的图中加号表示pcRAP-2，在SDS-PAGE上分离，转移到ECL-膜和以抗-phospho-⁶³Ser-c-Jun Abs(NEB)探测。显示于图7A的低的名单上的该膜以抗总的-c-Jun Abs作为对照重调查(NEB)。

然而，c-Jun总的量保持c-Jun的水平持稳的提高作为可能的修饰来源。特异于JNK1/2的磷酸化形式的抗体，没有探测到以RAP-2过量表达的活化的激酶的量有实质上的增加，显示c-Jun的附加的磷酸化作用没有产生于RAP-2-依赖性的提高的JNKs活性[图7(B)]。由Western印迹的有总的phospho-(¹⁸³Thr/¹⁸⁵Tyr)-JNK Abs(NEB)的溶菌产物如图7显示的，探测来自以hrTNF α 活化JNK1/2处理的pCDNA3或pcRAP-2转染的HEK-293T细胞的活化的JNK1/2细胞递增的时期。

在后一观念的进一步的支持，以免疫沉淀的JNK1和净化的GST-c-Jun作为反应物进行体外激酶试验本质上产生相同的结果[图7(C)]。以空载体，pcRAP-2和pcRIP以各种的与HA-JNK1-表达质粒一起共转染HEK-293T细胞经由起N-末端HA-tag免疫沉淀和通过³²P-incorporation in an in vitro kinase assay测定其细菌磷酸化产生净化GST-Jun的能力。通过SDS-PAGE分析反应产物，如显示于图7。

当转染的HEK293细胞免疫沉淀RAP-2-IKK1络合物，将该络合物在体外磷酸化作用情况下培养，RAP-2变成磷酸化。RAP-2的磷酸化作用的功能的作用的研究显示在该蛋白质(在位置148)家族的特定的丝氨酸的突变取消Jun磷酸化作用的活化。如图13阐明的，当野生的型RAP-2的过量表达致使Jun磷酸化作用对RAP-2过量表达的大量的增加，(S148A)这完全没有影响Jun的磷酸化作用。可是RAP2对NF-KB的影响完全没有受该突变的影响。这些调查结果显示RAP-2的丝氨酸148的磷酸化作用特定地涉及其对JUN磷酸化作用的效果。

实施例6 RAP-2不抑制c-Jun和RelA结合到DNA

考虑事实：实施例5报道的实验没有显示NF- κ B和AP-1发信号级联的RAP-2过量表达的cytosolic调节的目标，我们调查核的过程的完整性是转录必需的。用转染的HEK-293T细胞的核的提取液进行的Electro迁移率变化分析(EMSA)明确的证明RAP-2没有干扰c-Jun和RelA结合到对应于标准的识别序列的寡聚核苷酸(图8)。事实上，觉察到RAP-2转染的细胞中DNA/AP-1复合物形成的效力增加几倍。此外，在RAP-2和c-Jun/RelA之间没有观察到相互作用导致后者的活化区域sterical障碍。这暗示RAP-2进入核的作用在增强子结合出现的下游的某些位置被靶击。

实施例7 RAP-2与组蛋白乙酰转移酶TIP60的体内相互作用

TIP60(GeneBank U 74667)属于最近描述的核蛋白质的家族，被称为组蛋白乙酰转移酶(HATs)。这些蛋白质的酶的活性

与 nucleosomal complexes 的染色质结构的状态有关。HATs 经常地与转录装置的某一个的元件关联，和有能力调制转录的速率。通过借助于将乙酰基转移到组蛋白的赖氨酸残基在邻近开始时放松染色质 HATs 作用。从而促进各种的有关的因子进入 DNA。显然这些辅助核蛋白质之一想要促进增强子结合因子和 DNA 聚合酶 II 之间的交叉交谈。我们因此调查是否 TIP60 与 RAP-2 复合。来自 HeLa 细胞的免疫沉淀，随后进行两个杂交测试结论性显示 RAP-2 与 TIP60 在两个系统中激烈地互相影响。然而，根据在 HEK-293T 细胞中的共表达，我们没有能够看到 RAP-2 介导的对 NF- κ B 和 c-Jun 的影响的相当的改变。在控制试验中即刺激 TIP60 (w/o RAP-2) 观察的同样地失去变化，产生结论：短的时间读出 (转染之后 20-30 小时) 或许排除报道 DNA 进入变成染色质化的机会，没有剩下足够的时间以便 HAT-相似的酶起作用。

实施例 8 克隆 #10-与 RAP-2 相互制约新的蛋白质

在 B-细胞的 cDNA 文库中的两个杂交筛选中作为饵的全长 RAP-2 蛋白质，我们已经分离与表示为 RAP-2 的下文的克隆 #10 或克隆 #10-编码的蛋白质或 RAT-结合的蛋白质 #10 或 RBP-10 (图 10)。相互制约的新的蛋白质。发现原始的克隆 (约 2.2kb) 编码表面上的 MW 为 60kDa 的假定的多肽。然而，推定的 ATG 最初的密码子显然地从该序列遗失的。尽管其相当大的长度，因此获得的 cDNA 进一步向 5' 末端扩大以重新构成整个开放读框。

克隆 #10 的结合全部技能的二个杂种测定显示除 RAP-2 之外该蛋白质具有与 TRAP2 的相当强烈的亲合力。克隆 #10 没有结合到 RIP, TRADD, MORT1, MACH, TNFR-I, TIP60 和 NIK 以及

结合到几个对照蛋白质(例如lamin和cyclin)。但是可以排除克隆#10与NIK的结合可以存在于哺乳动物细胞,考虑到行为在酵母中的怪癖。证明克隆#10在后者的C-末端的200各氨基酸内结合到RAP-2,即与RIP, TIP60, NIK和IKK β 结合不是必要的区域。

克隆#10与TRAF-2在哺乳动物中293T细胞中的共表达阻止TRAF2-介导的NF- κ B的激活,而克隆#10与NIK的共表达被后者强有力地提高了NF- κ B的活化。这些调查结果指示克隆#10的重要的调节功能。观察到的不同的调节作用或许暗示细胞内存在不同的非重叠的蛋白质作用地点。

对GenBank的数个目标在识别接近的RBP-10-同系物的巡回搜查导致产生识别F40F12.5(登记入册号S42834)-来自C.Elegans的hypotetical的蛋白质,其中指派没有生理学的作用。有趣的,发现F40F12.5显示与广泛地保受的ubiquitin-指导的蛋白酶家族的几个成员有相似性。这些酶平衡了ubiquitination机器的破坏的作用,已知它指控细胞中的大半蛋白质降解。而ubiquitin连接酶负责将聚-ubiquitin树状物结合到预定降解的蛋白质,ubiquitin蛋白酶阻止成长的树状物有效的发枝。然而基于蛋白酶与上面的ubiquitin指导的蛋白酶的类似性的F40F12.5的功能的这样的推测似乎是可疑的,同样地还没有检测是否特定的蛋白质具有对ubiquitin聚合物的酶活性,此外,一对观点似乎完全不太可能发生这样的巧合:

a)据认为在ubiquitin蛋白酶的亚纲中构成核心催化区域的残基在F40F12.5,和在RBP-10中都不是保守的;

b)除了起源各种的种的ubiquitin指导蛋白酶家族的酶的催化的位点(从细菌到人)事实上没有显示序列类似处,而F40F12.5和

克隆#10显示可靠的程度的同源性。

实施例9 克隆#84:RAP-2的相互制约的蛋白质

通过应用在B-细胞的cDNA文库中的两个杂交筛选中作为饵的全长RAP-2蛋白质，我们已经分离了另外的RAP-2的结合的蛋白质，并称为克隆#84。

发现克隆#84特定地结合到全长RAP-2，而与其它分析的蛋白质TRAF2，MORT1，TRADD，RIP，NIK，TIP60和Lamin没有显示相互作用。发现克隆#84的部分5'-序列完全相同于编码细胞生长受控制的蛋白质CGR19的先前克隆的cDNA序列，识别为在携带功能的p53蛋白质的(Madden S.等人1996，登记入册#U66469)细胞中特定地向上调节的转录物。序列分析的CGR19导致在其-末端区域识别了C₃HC₄-Zink指基序(也称为RING指)。发现CGR19的表达抑制几个细胞系的生长。通过结合到RAP-2在NF- κ B的调节中CGR19的蛋白质的牵连可能由TNF-R家族的成员调节细胞周期受控制的网络。

实施例10 RAP-2的结构-功能的关系

A.结合区域

通过使用连续的缺失分析，对RAP-2内的结合区域作图和识别了RIP，NIK，TIP60-结合以及自我关联区域(图11)。

已经对结合到RIP的RAP-2蛋白质的区域作图，该区域位于氨基酸177-218之间和在氨基酸264结束。

至今没有发现IKK β 和NIK结合位置(氨基酸95-264)和(氨基

酸1-264)各自地在RAP-2内重叠RIP's结合位点RAP-2(图11)。

显然地结合到TIP60在横跨氨基酸95-264的区域作图。与横跨氨基酸95-309的缺失片段相互作用大多数的有可能是属于特定的缺失的特异的妨碍物构象的结果。

可以注意到在结合到缺失片段其结合到克隆#10和结合到自我关联的RAP-2的相似差异。然而与TIP60相反,事实是全长RAP-2结合到含有氨基酸218-416的缺失片段以及包含氨基酸1-264的缺失片段,暗示涉及最高的二聚化的区域定位于氨基酸217-264之间。

由克隆#10编码的蛋白质,具有上述的例外,显然地结合在开始于氨基酸218-309区域和终止在氨基酸416,因此,其结合位点可以包含具有RIP, NIK, IKK β 和TIP60(图11)的结合位点的重叠区域。

B.功能的区域

我们现在知识的程度,在同样的区域对RAP-2的所有的功能作图(称为NF- κ B抑制和诱导c-Jun的超磷酸化作用)(图11)。

此外,可能通过所有的用于实验的诱导物的发信号的有效调节的区域定位于该蛋白质片断的N-末端。

由氨基酸95-416包括的区域有效果,虽然与由完整的蛋白质引起相比明显更弱,因此由内源的RAP-2的聚集产生的。

而且,除了RelA,用于实验的所有的诱导物的作用由小到约RAP-2的100个N-末端的氨基酸介导的。事实上,包括氨基酸1-102个的片段介导不同的作用,尽管相当地适度的[图12(B)]。

另一方面,RelA的成功诱导需要更长部分的RAP-2蛋白

质。至今我们规定该区域氨基酸1-264之间的分界线，表面上赋予具有一部分特定的RelA-关联的结合属性的氨基酸157-264之间的区域。

C.结合-功能的关系

根据显示于图11和图12的结果，它似乎：

a)除了RelA，对于该蛋白质的功能，结合到RIP的RAP-2，克隆#10和最大可能结合到NIK和TIP60不必需的，作为过量表达诱导的NF- κ B的抑制物。

b)RAP-2对RelA过量表达的诱导活化的作用明显地至少部分地由不同的结合事件介导的。本质上，发现所有的上述的蛋白质可以有助于约定的活性，例如从至今进行的试验推论的。

RAP-2和RIP之间的相互作用的精确的位置至今有待测定，但是似乎该位置是特异于RIP和RAP-2，和不与其它的已知的于RIP互相影响的蛋白质例如MORT-1，TRADD，FAS-R和可能也TRAF2(见Malinin等人，1997)共享，也出现(根据序列分析和与上述的不同的数据库序列比较)RAP-2没有‘死亡区域’，MORT MODULE，一个蛋白酶区域(例如ICE/CED3基序)，激酶区域/基序/没有TRAF区域。在该线路，生物学的活性分析也显示RAP-2明显具有下列的特性：

(i)当过量表达，RAP-2由TNF或由TRADD，RIP，TRAF-2，NIK或p65 NF- κ B亚单位强有力地抑制NF- κ B的活化，

(ii)RAP-2加强c-Jun超磷酸化作用，没有变更JNK的活性。

(iii)如缺失分析显示的RAP-2不需要RIP的死亡区域，也不需要RIP的激酶活性以便结合到RIP；

(iv)基于上述的缺失分析，RAP-2结合到RIP的区域被缩减

到200个氨基酸的N-末端区域；

(v)在哺乳动物细胞中，而不是在酵母中RAP-2结合到NIK。

考虑上述的RAP-2似乎是非常特异的RIP结合蛋白质和因此RIP调节剂/调解剂有可能的涉及RIP-介导的胞内的发信号途径。

基于上述的结论，显示RAP-2参与RIP活性的调节/介导。胞内地，这些RIP参与细胞存活途径(NF- κ B活化，可能经由与TRAF2的相互作用)和参与炎症和细胞死亡途径(独立地经由其‘死亡区域’或经由与其它的蛋白质例如MORT-1, TRADD, p55-R, FAS-R和关联的蛋白酶的相互作用和例如MACH, Mch4, GI等)。其中RAP-2可以调制/介导RIP活性的可能的方法在上文详细的描述。例如RAP-2-RIP的相互作用可以导致至细胞死亡或细胞存活途径的增强，或可以引导细胞死亡或细胞存活途径的抑制，该加强或抑制可能依赖于这些二个相反的胞内的途径的有关的其它的成员的活性。RAP-2也可以具有入坞蛋白质的作用以提供RIP分子和其它的RIP-或RAP-2结合蛋白质的聚集，基于细胞中这些途径的其它的成员的活性量，其聚集体然后在细胞死亡或细胞存活(或甚至两者)的方向具有功能。

实施例11 抗RAP-2的多克隆抗体的制备

最初以5微克RAP-2的纯的制剂皮下注射兔子，该制剂由RAP-2乳化于完全的Freund助剂获得的。三个星期以后，以5微克RAP-2的纯的制剂皮下又注射兔子，该制剂由RAP-2乳化于不完全的Freund助剂获得的，以10天的间隔注射另外的二个溶解于PBS的RAP-2。在最后的免疫之后10天从兔子取血。接着以放

放射性免疫法显示抗体水平。将¹²⁵I-标志的RAP-2与兔子血清的各自的稀释物(1:50, 1:500, 1:5,000和1:50,000)混合。在总的体积200微升中添加蛋白质-G琼脂糖珠子(20微升, Pharmacia)的悬浮液。在室温下将该混合物放置1小时, 然后洗涤珠子3次, 计数被束缚的放射性。将抗人leptin的兔子抗血清用作为阴性的对照, 与阴性的对照相比测定RAP-2的效价。

实施例12 抗RAP-2的单克隆抗体的制备

首先以2微克的完全的Freund助剂的乳剂的确净化RAP-2注射雌性动物Balb/C老鼠(3个月大), 和三个星期以后, 以不完全的Freund助剂皮下注射, 以10天的间隔以溶解于PBS的另外的三个皮下注射。在融合到小鼠之前4天和3天腹膜内的最后的增加注射, 如IRIA测定的显示最高的结合效价(参见下文)。使用从作为融合伙伴的动物的脾脏和淋巴结准备好的myeloma细胞系和淋巴细胞进行融合。将融合的细胞分布到微培养盘, 和在补充了HAT和15%马血清的DMEM中挑选杂交瘤, 和被发现产生抗RAP-2的抗体的杂交瘤经过限制的稀释方法亚克隆和注射到Balb/C老鼠, 该老鼠已经以姥鲛烷灌注以便产生腹水。使用商用的ELISA试剂盒规定抗体的同位型(Amersham, UK)。

如下进行对产生抗RAP-2的单克隆抗体的杂交瘤的筛选: 经过倒置固体相放射免疫测定法(IRIA)测试杂交瘤上层清液中存在的抗RAP-2抗体。以Talon-纯化的IL-18BPa-His₆(10微克/ml, 100微升/well)包被ELISA板(Dynatech Laboratories, Alexandria, VA)。在4度孵育整夜之后, 以含有BSA(0.5%)和Tween20(0.05%)的PBS洗涤平板两次, 封闭于洗涤溶液最少2小

时，37度，添加杂交瘤培养物上层清液(100微升/well)和将该平板在37℃培养4小时。洗涤该平板3次和在室温下添加山羊-抗-小鼠辣根过氧化物酶(HRP, Jackson Labs, 1:10,000, 100微升/well)的轭合物2小时。将平板洗涤4次和由ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma)和H₂O₂作为底物显色。由自动的ELISA阅读器读取该平板。比阴性的对照值至少高5倍的获得OD的样品被认为阳性的。

采用亲和层析将RAP-2抗体用于纯化RAP-2。

实施例13 ELISA测试

在4℃以抗-RAP-2单克隆抗体(没有血清的杂交瘤上清液或腹水液体免疫球蛋白)包被微滴板(Dynatech或Maxisorb by Nunc)。以含有BSA(0.5%)和Tween20(0.05%)的PBS洗涤平板，封闭于相同的溶液最少2小时，37度，加入到wells(100微升/well)4小时，37℃，将该平板以含有Tween20(0.05%)的PBS洗涤3次。在4度添加抗-RAP-2血清(1:1000, 100微升/well)以进一步的孵育过夜，将该平板洗涤3次，在室温下添加山羊-抗-小鼠辣根过氧化物酶(HRP, Jackson Labs, 1:10,000, 100微升/well)的轭合物2小时。将平板洗涤4次和由ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma)和H₂O₂作为底物显色。由自动的ELISA阅读器读取该平板。

现在全部描述了本发明，本领域内技术人员领会宽的范围的等价物的参数，浓度和情况同样可以进行，不背离发明的精神和范围和没有过度的实验。

当结合具体的实施例来描述本发明时，可对本发明做进一步修饰。通常按照本发明的原则计划将该申请覆盖本发明的任何的变化，使用，或适应和包括偏离本发明公开的内容，如本领域内已知的或习惯的实践，其中涉及本发明和如可以应用到，根据下文的附加权利要求的范围上文提出的必要的特性。

在此处记载的所有的参考，包括杂志文章或摘要，公开的或对应的美国或由美国授权的外国的专利申请或其它的参考全部引入本文作为参考，包括在记载的参考中的所有的资料，表格，图形和正文。另外，在记载于本文的参考文献的全部内容引入本文作为参考。

参照已知的方法步骤，常规的方法步骤，已知的方法或常规的方法不准许以任何的方法公开，教导或建议本发明的任何的方面，说明书或实施例。

前面描述的具体实施例充分地显示本发明全面的本性，通过应用本领域内技术人员知识包括所附的参考文献的内容易于修饰和/或适应各种的应用的具体的实施例，不需要过度的实验，不背离本发明的一般概念。因此，计划将这样的适应和修饰包括在公开的实施例的意义和范围的同等物，基于本文描述的教导和指导。将会理解本文的措辞或术语是为了描述的目的，不是为了限制发明，因此本说明书的术语或措辞由熟练的技工根据本文的教导和指导，结合本领域普通技术人员的知识进行解释。

参考文献

- Alnemri, E.S.等人(1995)生物化学杂志270:4312-4317。
- Barinaga, M.(1993)科学262:1512-1514。
- Beg, A.A.和Baltimore, D.科学274:782-784。
- Beidler, J.等人, (1995)生物化学270:16526-16528。
- Berger, J.等人(1988)基因66:1-10。
- Beutler, B.和Cerami, C.(1987)NEJM:316:379-385。
- Bigda, J.等人(1994)实验方法学杂志180:445-460。
- Boldin, M.P.等人(1995a)生物化学杂志270:337-341。
- Boldin, M.P.等人(1995b)生物化学杂志270:7795-7798。
- Boldin, M.P.等人(1996)细胞85:803-815。
- Brakebusch, C.等人(1992)EMBO J., 11:943-950。
- Brockhaus, M.等人(1990)美国科学院年报87:3127-3131。
- Cantor, G.H.等人(1993)美国科学院年报90:10932-6。
- Cerreti, D.P.等人(1992)科学256:97-100。
- Chen, C.J.等人(1992)美国科学院年报660:271-3。
- Chinnaiyan等人(1995)细胞81:505-512。
- Chinnaiyan等人(1996)生物化学杂志271:4961-4965。
- Cifone, M.G.等人(1995)EMBO J.14:5859-5868。
- Clement, M.V.等人(1994)实验医学杂志180:557-567。

Crisell, P.等人(1993)核酸研究(英国)21(22):5251-5。

目前的分子生物学方案(Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., eds.), (1994) pp.8.1.1-8.1.6和16.7-16.7.8, Greene联合出版社公司和Wiley & Sons公司, 纽约。

Dirks, W., 等人, (1993)基因128:247-249。

Durfee, T.等人(1993)基因发展7:555-569。

Eischen, C.M.等人(1994)免疫学杂志153:1947-1954。

Ellis, H.M.等人(1986)细胞44:817-829。

Enari, M.等人(1995)自然375:78-81。

Engelmann, H.等人(1990)生物化学杂志265:1531-1536。

Faucheu, C.等人(1995)EMBO J.14:1914~1922。

Fernandes-Alnemri, T.等人(1994)生物化学杂志269:30761-30764。

Fernandes-Alnemri, T.等人(1995)癌症研究55:2737-2742。

Fernandes-Alnemri, T.等人(1996)美国科学院年报93:7464-7469。

Field, J.等人(1988)分子细胞生物学8:2159-2165。

Fields, S.和Song, O.(1989)自然340:245-246。

Frangioni, J.V.和Neel, B.G.(1993)生物化学分析210:179-187。

- Geysen, H.M.(1985)今天的免疫学6:364-369。
- Geysen, H.M.等人(1987)免疫方法杂志102:259-274。
- Gossen, M.和 Boujard, H.(1992)美国科学院年报, 89:5547-5551。
- Grell, M.等人(1994)欧洲免疫学杂志24:2563-2566。
- Heller, R.A.等人(1990)美国科学院年报87:6151-6155。
- Henkart, P.A.(1996)免疫性4:195-201。
- Hohmann, H.-P.等人(1989)生物化学杂志264:14927-14934。
- Howard, A.D.等人(1991)免疫学杂志147:2964-2969。
- Hsu, H.等人(1995)细胞81:495-504。
- Hsu, H.等人(1996)细胞84:299-308。
- Itoh, N.等人(1991)细胞66:233。
- Itoh, N.和 Nagata, S.(1993)生物化学杂志268:10932-7。
- Joseph, S.和Burke, J.M.(1993)生物化学杂志268:24515-8。
- Kamens, J.等人(1995)生物化学杂志270:15250-15256。
- Kaufmann, S.H.(1989)癌症研究49:5870-5878。
- Kaufmann, S.H.(1993)癌症研究53:3976-3985。
- Kischkel, F.C.等人(1995)EMBO J.14:5579-5588。
- Koizumi, M.等人(1993)生物医学(日本)16(9):879-83。
- Kumar, S.等人(1994)基因发展8:1613-1626。
- Kumar, S.(1995)生物化学科学趋势20:198-202。
- Lazebnik, Y.A.等人(1994)自然371:346-347。

- Leithauser, F.等人(1993)实验室投资学69:415-429。
- Li, Y.等人(1998)分子细胞生物学18:1601-1610。
- Loetscher, H.等人(1990)细胞61:351-359。
- Los, M.等人(1995)自然375:81-83。
- Madden, S.L.等人(1996)癌症研究56:5384-5390。
- Malinin, N.L.等人(1997)自然385:540-544。
- Martin, S.J.等人(1995)生物化学杂志270:6425-6428。
- Mashima, T.等人(1995)生物化学生物物理研究通信
209:907-915。
- Miller, B.E.等人(1995)免疫学杂志154:1331-1338。
- Milligan, C.E.等人(1995)神经学15:385-393。
- Miura, M.等人(1995)美国科学院年报92:8318-8322。
- Munday, N.A.等人(1995)生物化学杂志270:15870-15876。
- Muranishi, S.等人(1991)药物研究8:649。
- Musti AM, 等人(1997)科学1997 275:400-402。
- Nagata, S.和Golstein, P.(1995)科学267, 1449-1456。
- Natoli, G.等人(1997)生物化学杂志272, 26079-26082。
- Nicholson, D.W.等人(1995)自然376:37-43。
- Nophar, Y.等人(1990)EMBO J., 9:3269-3278。
- Piquet, P.F.等人(1987)实验医学杂志166:1280-89。

- Ray等人(1992)细胞69:597-604。
- Ruggiero, V.等人(1987)细胞免疫学107:317-325。
- Sambrook等人(1989)分子克隆:实验室手册, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约。
- Schall, T.J.等人(1990)细胞, 61:361-370。
- Schlegel等人(1996)生物化学杂志271:1841-1844。
- Schulze-Osthoff, K.等人(1994)EMBO J.13:4587-4596。
- Shimayama, T.等人(1993)Nucleic Acids Symp.Ser.29:177-8.
- Shore, S.K.等人(1993)致癌基因8:3183-8。
- Sleath, P.R.等人(1990)生物化学265:14526-14528。
- Smith, C.A.等人(1990)科学248:1019-1023。
- Song, H.Y.等人(1994)生物化学杂志269:22492-22495。
- Srinivasula, S.M.等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci.美国93:14486-14491。
- Stanger, B.Z.等人(1995)细胞81:513-523。
- Tartaglia, L.A.等人(1993)细胞74:845-853。
- Tewari, M.等人(1995)生物化学杂志270:3255-3260。
- Tewari, M.等人(1995a)生物化学杂志270:18738-18741。
- Tewari, M.等人(1995b)细胞81:1-20。
- Thornberry, N.A.等人(1992)自然356:768-774。
- Thornberry, N.A.等人(1994)Biochemistry 33:3934-3940。

- Tracey, J.T.等人(1987)自然330:662-664。
- Van Antwerp, D.J.等人(1996)科学274:787-789。
- Vandenabeele, P.等人(1995)细胞生物学趋势5:392-400。
- Vassalli, P.(1992)Ann. Rev. Immunol. 10:411-452。
- Wallach, D.(1984)免疫学杂志132:2464-9。
- Wallach, D.(1986)参见:干扰素7(Ion Gresser, ed.), pp.83-122, 学术出版社, 伦敦。
- Wallach, D.等人(1994)细胞因子6:556。
- Wang, L.等人(1994)细胞78:739-750。
- Wang, C.Y.等人(1996)科学274:784-787。
- Watanabe-Fukunaga, R.等人(1992)自然356:314-317。
- Watanabe, F.R.等人(1992)免疫学杂志148:1274-1279。
- Weitzen, M.等人(1980)免疫学杂志125:719-724。
- Wilks, A.F.等人(1989)美国科学院年报86:1603-1607。
- Wong等人(1994)免疫学杂志152:1751-1755。
- Xue, D.等人(1995)自然377:248-251。
- Yamaoka, S.等人(1998)细胞95:1231-1240。
- Yonehara, S.等人(1989)实验方法杂志169:1747-1756。
- Yuan, J.等人(1993)细胞75:641-652。
- Zaccharia, S.等人(1991)欧洲药理学杂志203:353-357。
- Zhao, J.J.和Pick, L.(1993)自然(英国)365:448-51。

序列表

<110>WALLACH, David
KOVALENKO, Andrei
Yeda研究和开发有限公司

<120>TNF/NGF受体家族和其它蛋白质的受体的功能的调节剂

<130>TNF/NGF受体

<140>

<141>

<150>123758

<151>1998-03-19

<150>126024

<151>1998-09-01

<160>3

<170>PatentIn Ver.2.0

<210>1

<211>2009

<212>DNA

<213>人

<400>1

```
gaagattcca ttgtgggcct gsgaggccta gcaagggcgg accgcgaaac tgggactttt 60
ttcggagcgc cggggcccta ccagcgttca cagtccgccg ctcccacct tctcagctct 120
gacggactct gctgacagcc cttgccctgt tggatgaata ggcacctctg gaagagccaa 180
ctgtgtgaga tgggtgcagcc cagtgggtggc ccggcagcag atcaggacgt actgggcgaa 240
```

gagtctcctc tggggaagcc agccatgctg cacctgcctt cagaacaggg cgctcctgag 300
accctccagc gctgcctgga ggagaatcaa gagctccgag atgcatccg gcagagcaac 360
cagattctgc gggagcgctg cgaggagctt ctgcatttcc aagccagcca gagggaggag 420
aaggagtcc tcatgtgcaa gttccaggag gccaggaaac tggaggagag actcggcctg 480
gagaagctcg atctgaagag gcagaaggag caggctctgc gggaggtgga gcacctgaag 540
agatgccagc agcagatggc tgaggacaag gcctctgtga aagcccaggt gacgtccttg 600
ctcggggagc tgcaggagag ccagagtcgc ttggaggctg cactaagga atgccaggct 660
ctggagggtc gggcccgggc ggccagcgag caggcgggc agctggagag tgagcgcgag 720
gcgctgcagc agcagcacag cgtgcagggt gaccagctgc gcatgcaggc ccagagcgtg 780
gaggccgccc tccgcatgga gcgccaggcc gcctcggagg agaagaggaa gctggcccag 840
ttgcagggtg cctatcaca gctcttccaa gaatacgaca accacatcaa gagcagcgtg 900
gtgggcagtg agcgggaagcg aggaatgcag ctggaagatc tcaaacagca gctccagcag 960
gccgaggagg ccttggtggc caaacaggag gtgatcgata agctgaagga ggaggccgag 1020
cagcacaaga ttgtgatgga gaccgttccg gtgctgaagg cccaggcggg tatctacaag 1080
gcggacttcc aggctgagag gcaggcccgg gagaagctgg ccgagaagaa ggagctcctg 1140
caggagcagc tggagcagct gcagagggag tacagcaaac tgaaggccag ctgtcaggag 1200
tcggccagga tcgaggacat gaggaagcgg catgtcgagg tctcccaggc ccccttgcct 1260
cccgccctg cctacctc cctcccctg gccttgccta gccagaggag gagccccccc 1320
gaggagccac ctgacttctg ctgtccaag tgccagtatc aggccctga tatggacacc 1380
ctgcagatac atgtcatgga gtgcattgag tagggccggc cagtgaagg cactgcctg 1440
ccgaggacgt gcccgggacc gtgcagtctg cgcttctc tcccgcctgc ctagcccag 1500
atgaagggtt ggggtggccac aactgggatg ccacctggag cccacccag gagctggccg 1560
cggcacctta cgcttcagct gttgattccg ctggctcccct cttttggggt agatgcggcc 1620
ccgatcaggc ctgactcgt gctctttttg tcccctctg tetgctcga ccacttgcct 1680
cgggctaate cctccctctt cctccaccg gcactgggga agtcaagaat ggggcctggg 1740
gctctcaggg agaactgctt cccctggcag agctgggtgg cagctcttcc tcccaccgga 1800
caccgaccg cccgctgctg tgccctggga gtgctgcct cttaccatgc acacgggtgc 1860
tctcctttg ggctgcatgc tattcattt tgcagccaga ccgatgtga ttaaccagt 1920
cactattgat ggacatttg gttgttccc atcttttgt tacatmaat artggcmtag 1980
akaaaatcc ttgtgatta aaaaaaaaaa 2009

<210> 2

<211> 2034

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

```
ttctactect cctcctcct cactgceggg tctgacccta ctcttgtgt gaggactcct 60
ctagttcaga gacatattct gttcaccaaa cttgactgcg ctctatcgag gtcgttaaata 120
tcttcggaaa tgcctcacat atagtttggc agctagccct tgccctgttg gatgaatagg 180
cacctctgga agagccaact gtgtgagatg gtgcagccca gtggtggccc ggcagcagat 240
caggacgtac tgggcgaaga gtctcctctg gggaagccag ccatgctgca cctgccttca 300
gaacagggcg ctctgagac cctccagcgc tgccctgggag gagaatcaag agctccgaga 360
tgccatccgg cagtagcaac cagattcttg cgggagctgc cgaagggagc tttctgcatt 420
ttccaagcca gccagagggg ggagaaggag ttctcatgt gcaagttcca ggaggccagg 480
aaactggtgg agagactcgg cctggagaag ctcgatctga agaggcagaa ggagcaggct 540
ctgcgggagg tggagcacct gaagagatgc cagcagcaga tggctgagga caaggcctct 600
gtgaaagccc aggtgacgtc cttgctcggg gagctgcagg agagccagag tcgcttgag 660
gctgccacta aggaatgcca ggctctggag ggtcgggccc gggcggccag cgagcaggcg 720
cggcagctgg agagtgagcg cgaggcgtg cagcagcagc acagcgtgca ggtggaccag 780
ctgcgcatgc agggccagag cgtggaggcc gcgctccgca tggagcgcca ggccgctctg 840
gaggagaaga ggaagctggc ccagttgcag gtggcctatc accagctctt ccaagaatac 900
gacaaccaca tcaagagcag cgtggtgggc agtgagcgga agcgaggaat gcagctggaa 960
gatctcaaac agcagctcca gcaggccgag gaggccctgg tggccaaaca ggaggtgatc 1020
gataagctga aggaggaggc cgagcagcac aagattgtga tggagaccgt tccggtgctg 1080
aaggcccagg cggatatcta caaggcggac ttccaggctg agaggcaggc ccgggagaag 1140
ctggccgaga agaaggagct cctgcaggag cagctggagc agctgcagag ggagtacagc 1200
aaactgaagg ccagctgtca ggagtcggcc aggatcgagg acatgaggaa gcggcatgtc 1260
```

gaggtctccc aggccccctt gcccccgcc cctgcctacc tctctctcc cctggccctg 1320
 cccagccaga ggaggagccc ccccaggag ccacctgact tctgctgtcc caagtgccag 1380
 taccaggccc ctgatatgga caccctgcag atacatgtca tggagtgcac tgagtagggc 1440
 cggccagtgc aaggccactg cctgccgagg acgtgcccg gaccgtgcag tctgcgcttt 1500
 cctctcccgc ctgcctagcc caggatgaag ggctgggtgg ccacaactgg gatgccacct 1560
 ggagccccac ccaggagctg gccgcggcac cttacgcttc agctgttgat tccgctggtc 1620
 ccctcttttg gggtagatgc ggccccgatc aggcctgact cgctgctctt tttgttccct 1680
 tctgtctgct cgaaccactt gcctcgggct aatccctccc tcttctcca cccggcactg 1740
 gggaaagtcaa gaatggggcc tggggctctc agggagaact gcttcccctg gcagagctgg 1800
 gtggcagctc ttctccac cggacaccga cccgcccgt gctgtgccct gggagtgtg 1860
 ccctcttacc atgcacacgg gtgctctctt tttgggctgc atgctattcc attttcagc 1920
 cagaccgatg tgtatttaac cagtcactat tgatggacat ttgggttgtt tccatcttt 1980
 ttgttaccat maatartggc mtagakaaaa atccttgtgc attaaaaaaaa aaaa 2034

<210> 3

<211> 2116

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

gccacgaagg cccagacttt gaccgttctt caccaccact ccagcctcct cctgtgaact 60
 cactgaccac cgagaacaga ttccactctt taccattcag tctcaccag atgcccata 120
 ccaatggaag tattggccac agtccacttt ctctgtcagc ccagtctgta atggaagagc 180
 taaacactgc acccgccaa gagagtccac ccttggccat gcctcctggg aactcacatg 240
 gtctagaagt gggctcattg gctgaagtta aggagaacc cctttctat ggggtaatcc 300
 gttggatcgg tcagccacca ggactgaatg aagtgtctgc tggactggaa ctggaagatg 360
 agtgtgcagg ctglacgat ggaaccttca gaggcactcg gtatttcacc tgtgccctga 420
 agaaggcgct gtttgtgaaa ctgaagagct gcaggcctga ctctaggtt gcatcattgc 480
 agccggttcc caatcaagat tgagcgtgt aactctttag catttggagg ctacttaagt 540
 gaagtagtga agaaaatact ccacaaaaaa tggaaaaaga argcttgag ataatgattg 600

gggaaagaag aaaggcatcc aagggtcatt acaattcttg ktacttagac tcaaccttat 660
tctkgcttat tikgctttta gttctgttct nggacactgg tgttacttta gaccccaaag 720
aaaaagaaac gatgtagaa tattwtwkwg mmaccaaga gctactgagg acagaaattg 780
ttaatcctct gagaatatat ggatatgtgt gtgccacaaa aattatgaaa ctgaggaaaa 840
tacttgaaaa ggtggaggct gcatcaggat ttaccttga agaaaaagat cctgaggaat 900
tcttgaatat tctgtttcat catattitaa gggtagaacc ttgctaaaa ataagatcag 960
caggtaaaaa ggtacaagat tgttacttct atcaaatttt tatggaaaaa aatgagaaaag 1020
ttggcgttcc cacaattcag cagttgtag aatggctttt tatcaacagt aacctgaaat 1080
ttgcagaggc accatcatgt ctgattattc agatgcctcg atttgaaaa gactttaaac 1140
tatttaaaaa attttcctt ctctggaatt agatataaca gatttacttg aagacacccc 1200
agacagtgcc ggatatgtgg agggcttgca atgtatgagt gtaagaatgc tacgacgatc 1260
cggacaccag ctggaaaaac aagcagtttt gtaaacctg caaacactca gteccacttc 1320
atccgaagag gctgaatcat aatataacc cagtgtcact ccccaaagac ttaccccgac 1380
tgggagattg gagacacggc tgcattcctt gccagaatat ggagttattt gctgttctct 1440
gcatagaaac aagccactat gttgcttttg tgaagtatgg gaaggacgat tctgcctggc 1500
tcttcttttg acagcatggc cgatccggga tgggtggtcag aatggctcaa cattccccca 1560
agtemccemt gscocagaag taggagagta cttggaagat gtctctgga agaccctgaa 1620
wtyccttga ctcccaggag aatcccaagg ctgtgcacga agactgcttt gtgatgcat 1680
atatgtgcca tgtaccaga gtccaacaat gagttgtac aaataactgg gggtcatcgg 1740
gaaaggcaaa gaaactggaa ggcagagtcc ctaacgttgc atcttattcg gagctggcag 1800
ttctgttcac ggtccattgc cggcaatgga tgtctttgtg gtgatgatcc ttcagaaaag 1860
gatgcctctg tttaaaaaca aattgctttt gtgtccctga agtatttaat aagaagcatt 1920
ttgcactcta gaaagtatgt ttgtgttggg ttttaagaa gtctaaatga agttattaat 1980
acctgaagct ttaagttaag tgcattgatc atatgatatt ttggaagca tacaatttta 2040
attgtggaag tttaaagcct ctttagtcc attgagaatg taaataaatg tgtcttcttt 2100
atggaaaaaa aaaaaa 2116

		10		20		30		40		50		50
1	GAAGATTCCA	TTGTGGCCT	GSGAGCCTA	GCAAGGCGG	ACCGGAAC	TGGACTTT	60					
51	TTCGGAGCGC	CGGGCCCTA	CCAGCGTTCA	CAGTCCGCCG	CTCCCACCT	TCTCACGTCT	120					
121	GACGGACTCT	GCTGACAGCC	CTTGCCCTGT	TGGATGAATA	GGCACCTCTG	GAAGAGCCAA	180					
181	CTGTGTGA	TGGTGCAGCC	CAGTGGTGGC	CCGGCAGCAG	ATCAGGACGT	ACTGGGGAA	240					
241	GAGTCTCCTC	TGGGGAAGCC	AGCCATGCTG	CACCTGCCTT	CAGAACAAGG	CGTCCCTGAG	300					
301	ACCCCTCCAGC	GCTGCCCTGGA	GGAGAATCAA	GAGCTCCGAG	ATGCCATCCG	GCAGAGCAAC	360					
361	CAGATTCTGC	GGAGCGCTG	CGAGGAGCTT	CTGCATTTC	AAGCCAGCCA	GAGGAGGAG	420					
421	AAGGAGTTCC	TCAATGCAA	GTTCCAGGAG	GCCAGGAAAC	TGGTGGAGAG	ACTCGGCTG	480					
481	GAGAAGCTCG	ATCTGAAGAG	GCAGAAGGAG	CAGGCTCTGC	GGGAGGTGGA	GCACCTGAAG	540					
541	AGATGCCAGC	AGCAGATGGC	TGAGGACAAG	GCCTCTGTGA	AAGCCCAGGT	GACGTCCCTG	600					
601	CTCGGGGAGC	TGCAGGAGAG	CCAGAGTCCG	TTGGAGGCTG	CCACTAAGGA	ATGCCAGGCT	660					
661	CTGGAGGGTC	GGCCCCGGC	GGCCAGCGAG	CAGGCGCGC	AGCTGGAGAG	TGAGCGCGAG	720					
721	GCGCTGCAGC	AGCAGCACAG	CGTGCAAGTG	GACCAGCTGC	GCATGCAGGG	CCAGAGCGTG	780					
781	GAGGCCGCGC	TCCGCATGGA	GCGCCAGGCC	GCCTCGGAGG	AGAAAGAGAA	GCTGGCCCCAG	840					
841	TTGCAGGTGG	CCTATCACCA	GCTCTTCCAA	GAATACGACA	ACCACATCAA	GAGCAGCGTG	900					
901	GTGGGCAGTG	AGCGGAAGCG	AGGAATGCAG	CTGGAAGATC	TCAAACAGCA	GCTCCAGCAG	960					
961	GCCGAGGAGG	CCCTGGTGGC	CAAACAGGAG	GTGATCGATA	AGCTGAAGGA	GGAGGCCGAG	1020					
1021	CAGCACAGA	TTGTGATGGA	GACCGTTCCG	GTGCTGAAGG	CCCAGGCCGA	TATCTACAAG	1080					
1081	GCGGACTTCC	AGGCTGAGAG	GCAGGCCCCGG	GAGAAGCTGG	CCGAGAAGAA	GGAGCTCCTG	1140					

图 1(A)

```

1141 CAGGAGCAGC TGGAGCAGCT TGGAGGGAG GCAGAGGGAG TACAGCAAC TGAAGGCCAG CTGTCAGGAG 1200
1201 TCGGGCCAGGA TCGAGGACAT GAGGAAGCGG CATGTCGAGG TCTCCCAGGC CCCCTTGCCC 1260
1261 CCCGCCCCCTG CCTACCTCTC CTCTCCCCCTG GCCCTGCCCA GCCAGAGGAG GAGCCCCCCC 1320
1321 GAGGAGCCAC CTGACTTCTG CTGTCCCAAG TGCCAGTATC AGGCCCTGA TATGGACACC 1380
1381 CTGCAGATAC ATGTCATGGA GTGCATTGAG TAGGGCCGGC CAGTGCAAGG CCACTGCCCTG 1440
1441 CCGAGGACGT GCCCGGACC GTGCAGTCTG CGCTTCCCTC TCCCGCCTGC CTAGCCCCAGG 1500
1501 ATGAAGGGCT GGGTGGCCAC AACTGGGATG CCACCTGGAG CCCACCCAG GAGCTGGCCG 1560
1561 CGCACCTTA CGCTTCAGCT GTTGATTCCG CTGGTCCCTT CTTTGGGGT AGATGCGGCC 1620
1621 CCGATCAGGC CTGACTCGCT GCTCTTTTGG TTCCCTTCTG TCTGCTCGAA CCACTTGCCCT 1680
1681 CGGGCTAATC CCTCCCTCTT CCTCCACCCG GCACTGGGA AGTCAAGAAT GGGCCCTGGG 1740
1741 GCTCTCAGGG AGAACTGCTT CCCCTGGCAG AGCTGGGTGG CAGCTCTTCC TCCCACCCGA 1800
1801 CACCGACCCG CCCGCTGCTG TGCCCTGGGA GTGCTGCCCT CTTACCATGC ACACGGGTGC 1860
1861 TCTCCTTTTG GGCTGCATGC TATTCCATT TGCAGCCAGA CCGATGTGA TTTAACCCAGT 1920
1921 CACTATTGAT GGACATTTGG GTTGTTTCCC ATCTTTTGT TACCATMAAT ARTGGCMTAG 1980
1981 AKAAAAATCC TTGTGCATTA AAAAAAAA
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60

```

图 1(B)

```

      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60
1  TTCTACTCCT CCCTCCTCCT CACTGCGGGG TCTGACCCCTA CTCCTTGTTG GAGACTCCT 60
61 CTAGTTCAGA GACATATTCT GTTCACCAAA CTTGACTGCG CTCTATCGAG GTCGTTAAAT 120
121 TCTTCGGAAA TGCCTCACAT ATAGTTTGGC AGCTAGCCCT TGCCCTGTTG GATGAAATAGG 180
181 CACCTCTGGA AGAGCCAACT GTGTGAGATG GTGCAGCCCA GTGGTGGCCC GGCAGCAGAT 240
241 CAGGACGTAC TGGCGGAAGA GTCTCCTCTG GGAAGCCAG CCATGCTGCA CCTGCCTTCA 300
301 GAACAGGGCG CTCCCTGAGAC CCTCCAGCGC TGCCCTGGAG GAGAATCAAG AGCTCCGAGA 360
361 TGCCATCCGG CAGTAGCAAC CAGATTCTTG CGGAGCTGC CGAAGGAGC TTTCTCCATT 420
421 TTCCAAGCCA GCCAGAGGGA GGAGAAGGAG TTCCCTCATGT GCAAGTTCCA GGAGCCAGG 480
481 AAACCTGGTG AGAGACTCGG CCTGGAGAAG CTCGATCTGA AGAGGCAGAA GGAGCAGGCT 540
541 CTGCGGGAGG TGGAGCACCT GAAGAGATGC CAGCAGCAGA TGGCTGAGGA CAAGCCCTCT 600
601 GTGAAAGCCC AGGTGACGTC CTTGCTCGGG GAGCTGCAGG AGAGCCAGAG TCGCTTGGAG 660
661 GCTGCCACTA AGGAATGCCA GGCTCTGGAG GGTCCGGCCC GGGCCGCCAG CGAGCAGCGG 720
721 CGGCAGCTGG AGAGTGAGCG CGAGCCGCTG CAGCAGCAGC ACAGCGTGCA GGTGGACCAG 780
781 CTGCGCATGC AGGGCCAGAG CGTGGAGGCC GCGCTCCGCA TGGAGCGCCA GCGCCCTCG 840
841 GAGGAGAAGA GGAAGCTGGC CCAGTTGCAG GTGGCCTATC ACCAGCTCTT CCAAGATAC 900
901 GACAACCACA TCAAGAGCAG CGTGGTGGCC AGTGAGCCGA AGCGAGGAAT GCAGCTGGAA 960
961 GATCTCAAAC AGCAGTCCA GCAGGCCGAG GAGGCCCTGG TGGCCAAACA GGAGTGATC 1020
1021 GATAAGCTGA AGGAGGAGGC CGAGCAGCAC AAGATTGTGA TGGAGACCGT TCCCGTGTG 1080
1081 AAGGCCCAGG CGGATATCTA CAAGCGGAC TTCCAGGCTG AGAGGCAGGC CCGGAGAAG 1140

```

图 2(A)

1141	CTGCCCGAGA	AGAAGGAGCT	CCTGCAGGAG	CAGCTGGAGC	AGCTGCAGAG	GGAGTACAGC	1200
1201	AAACTGAAGG	CCAGCTGTCA	GGAGTCGGCC	AGGATCGAGG	ACATGAGGAA	GCGGCATGTC	1260
1261	GAGGTCTCCC	AGGCCCCCTT	GCCCCCCGCC	CCTGCCFPACC	TCTGCTCTCC	CCTGGCCCTG	1320
1321	CCCAGCCAGA	GGAGGAGCCC	CCCCGAGGAG	CCACCTGACT	TCTGCTGTCC	CAAGTGCCAG	1380
1381	TATCAGGCC	CTGATATGGA	CACCTGCAG	ATACATGTCA	TGGAGTGCCAT	TGAGTAGGGC	1440
1441	CGGCCAGTGC	AAGGCCACTG	CCTGCCGAGG	ACGTGCCCCGG	GACCCGTGCAG	TCTGCCCTTT	1500
1501	CCTCTCCCGC	CTGCCTAGCC	CAGGATGAAG	GGCTGGGTGG	CCACAACCTGG	GATGCCACCT	1560
1561	GGAGCCCCAC	CCAGGAGCTG	GCCCGGGCAC	CTTACGGCTC	AGCTGTTGAT	TCCGCTGGTC	1620
1621	CCCTCTTTTG	GGTAGATGC	GGCCCCGATC	AGGCCTGACT	CGCTGCTCTT	TTTGTTCCTT	1680
1681	TCTGTCTGCT	CGAACCACTT	GCCTCGGGCT	AATCCCTCCC	TCTTCCTCCA	CCCGGCACTG	1740
1741	GGGAAGTCAA	GAATGGGGCC	TGGGCTCTTC	AGGGAGAACT	GCTTCCCCTG	GCAGAGCTGG	1800
1801	GTGGCAGCTC	TTCCCTCCAC	CGGACACCGA	CCCGCCCGCT	GCTGTGCCCT	GGGATGCTG	1860
1861	CCCTCTTACC	ATGCACACGG	GTGCTCTCCT	TTTGGGCTGC	ATGCTATTCC	ATTTTGCAGC	1920
1921	CAGACCGATG	TGTATTTAAC	CAGTCACTAT	TGATGGACAT	TTGGGTTGTT	TCCCATCTTT	1980
1981	TTGTTACCAT	MAATARTGGC	MTAGAKAAAA	ATCCTTGTGC	ATTAAAAAAA	AAAA	2034
	10	20	30	40	50	60	

图 2(B)

20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	1 1 1 1	MNRHLWKSOLCEMVOPSGGPAADODVLGEEESPLGK MNKHPWKNQLSETVOESGGPAEDODMLGEESSLGK MNRHLWKSOLCEMYOPSGGPAADODVIGEEESPIIG
20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	36 36 1 35	PAMLHLPSEQGAPE TLQRCL EENQELRDAIRQSNQ PAMLHLPSEQGTPE TLQRCL EEMQELRDAIRQSNQ L S I Q
20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	71 71 4 35	ILRERCEELLHF OASORBEKEFLMCKFOEARKLV E MLRERCEELLHF OVSORWKEFLMCKFOEARKLV E MLRERCEELLHF OVSORBEKEFLMCKFOEARKLV E
20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	106 105 39 35	RLGLE - - - - - KLDLKR RLSLE KLE - - - - - KLDLRS RLSLE - - - - - KLDLRS OKEOALREVEHLKRCOOO MAE OREOALKELLEOLKKCOO OMAE OREOALKELLEOLKKCOO OMAE
20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	138 140 71 36	DKASVKAOVTSL LGLGEL OESOSRLE AATKEC OAL EGG DKASVKAOVTSL LGLGEL OESOSRLE AATKDR OAL EGG DKASVKAOVTSL LGLGEL OESOSRLE AATKDR OAL EGG DKASVKAOVTSL LGLGEL OESOSRWE
20.4 全长 NEMO 全长 鼠部分 人 <i>shrt</i>	173 175 106 60	RARAASEOAROLESE REALOOOHS VOVDOLRMOGO RIRAVSEOVROLESE REVL000HS VOVDOLRMONQ RIRAVSEOVROLESE REVL000HS VOVDOLRMRTR

图 3A(1)

20.4 全长	208	SVEAALRMEROAASEEKRLAOLQVAYHOLFQEYD
NEMO 全长	210	SVEAALRMEROAASEEKRLAOLQVAYHOLFQDYD
鼠部分	141	AWRLPCFWSGRLLQRRSGTGLQLQAAYHOLFQDYD
人 <i>shrt</i>	60	
20.4 全长	243	NHIKSSVVGSEKRGMOLEDLKKOOLQOAAEEALVAK
NEMO 全长	245	SHIKSSKGMOLEDLRQOLQOAAEEALVAK
鼠部分	176	SHIKSSKGMOLEDLRQOLQOAAEEALVAK
人 <i>shrt</i>	60	
20.4 全长	278	QEVIDKLLKEEAEOHKIVMETVPLVKAQADIYKADF
NEMO 全长	273	QELIDKLLKEEAEOHKIVMETVEVLKAQADIYKADF
鼠部分	204	QELIDKLLKEEAEOHKICDET
人 <i>shrt</i>	60	
20.4 全长	313	QAEHQAREKLAEKKELEQLEQLQREYSKLLKASC
NEMO 全长	308	QAEHQAREKLYEKKEYLQLEQLQREFNKLLKVGC
鼠部分	0	
人 <i>shrt</i>	60	
20.4 全长	348	QESARIEDMRKRHVEV SQAPLPPAPAYLSSPLALP
NEMO 全长	343	IESARIEDMRKRHVE-TOPPLLPAPAHHSFLLALS
鼠部分	0	
人 <i>shrt</i>	60	
20.4 全长	383	SQRRSPPEEPPDFCCPKCOYO-APDMDTLOIHVME
NEMO 全长	377	NQRRSPPEEPPDFCCPKCOYO-APDMDTLOIHVME
鼠部分	0	
人 <i>shrt</i>	60	CCPLTMTGALLGLGCMLEHFAA
20.4 full 全长	416	- - - C I E
NEMO 全长	411	- - - C I -
鼠部分	0	- - - - -
人 <i>shrt</i>	82	R P M C I -

图 3A(2)

20.4 全长	1	MNRH	WKSQ	LCEN	V	-	Q	P	S	G	G	P	A	D	D	V	L	G	R	E	S	P	L	G												
FIP-2 全长	1	-	-	-	-	-	M	S	H	O	R	L	S	C	L	T	E	K	E	D	S	P	S	T	G	N	G									
20.4 全长	35	K	P	A	M	L	I	L	P	S	E	Q	G	A	R	E	T	-	-	Q	R	C	E	E	N	Q	E	R	D	A	I					
FIP-2 全长	24	P	P	I	L	A	P	N	L	D	T	T	P	R	E	L	Q	Q	M	K	E	L	T	E	N	I	Q	K	E	A	M					
20.4 全长	66	R	Q	S	N	Q	I	L	R	E	R	C	R	E	L	L	H	F	Q	A	S	Q	R	E	K	E	L	M	C	K	F	O	B	A		
FIP-2 全长	59	K	L	N	N	Q	A	M	K	G	R	F	R	E	L	S	A	M	T	E	K	Q	K	R	E	R	Q	P	E	I	Q	S	K	E	A	
20.4 全长	101	R	K	L	V	E	R	I	G	L	E	K	L	D	L	K	R	Q	K	E	Q	A	L	R	E	V	E	H	L	K	R	C	Q	Q	M	
FIP-2 全长	94	K	-	-	-	-	E	R	L	-	-	M	A	L	S	H	E	N	E	K	L	K	E	R	L	G	K	L	K	G	K	S	E	R	S	
20.4 全长	136	A	E	D	K	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FIP-2 全长	122	S	E	D	P	T	D	D	S	R	L	P	R	A	E	A	E	Q	E	K	D	Q	L	R	T	Q	V	V	R	L	Q	A	E	K	A	D
20.4 全长	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIP-2 全长	157	L	L	G	I	V	S	E	L	Q	L	K	L	N	S	S	G	S	E	D	S	F	V	E	I	R	M	A	E	G	E	A	E	G	S	-
20.4 全长	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIP-2 全长	192	V	K	E	I	K	I	S	P	G	S	T	R	T	V	S	T	G	T	A	L	S	H	Y	R	R	S	A	D	G	A	K	N	Y	F	-
20.4 全长	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIP-2 全长	227	E	H	E	E	L	T	V	S	Q	L	L	C	L	R	E	G	N	Q	K	V	E	R	L	E	V	A	L	K	E	A	K	E	R	V	-
20.4 全长	141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIP-2 全长	262	S	D	F	E	K	K	T	S	N	R	S	E	I	E	T	Q	T	E	G	S	T	E	K	E	N	D	E	K	G	P	E	T	V	G	-

图 3B(1)

20.4 全长 FIP-2 全长	141 297	- - - S V K A Q V T S L G E L O B S Q S R E A A T - - - - - S E V E A L N L O V T S L F K E L O B A H T K M S E A E L M K K R L Q
20.4 全长 FIP-2 全长	165 332	K E C Q A L E G R A R A S E Q A R Q L E S E R E A L Q Q Q H S V Q V E K C Q A L E - - - R K N S A I P S E L N E K Q R L V Y P N K - - - -
20.4 全长 FIP-2 全长	200 360	D Q L R M Q G Q S V E A A L R M E R Q A A S E R K R K L A Q L O V A Y - K L E L O V E S M L S E I K M E Q A K T E D E K S K I T V L Q M T I I
20.4 全长 FIP-2 全长	235 394	H Q L F O B Y D N H I K S - - - S V G S E R K R G M Q L E D I K Q N K L L O B H N A L K T I E E L T R K E S E K V D R A V I K E L S E
20.4 全长 FIP-2 全长	266 429	Q L Q Q A B E A L V A K Q E V I D K L K E E A E Q I K I V M T T V P V K L E L A B K A L A S K O L Q M D E M K Q T I A K O E E D L E T M T I I
20.4 全长 FIP-2 全长	301 464	L K A Q A D I Y K A D E Q A E R Q A R B K L A E K K E L L Q E O L E Q L R A O M E Y Y C S D E H A E R A A R E K I J H E E K E Q L A L O L A V
20.4 全长 FIP-2 全长	336 499	L Q R E Y S K L K A S C Q E S A R I E D M R K R H - V E V S Q A P L P L L K E N D A F E D G G R Q S - - L M E M Q S R H G A R T S D S - - -
20.4 全长 FIP-2 全长	370 529	P A P A Y L S S P L A L P S Q R R S P P E P R D F C C R K C Q Y Q A D Q Q A Y L V Q R G A E D R D W R R Q Q - R N I R I H S C R K C G E V L
20.4 全长 FIP-2 全长	405 563	F I P M D T I O T H Y M E G I I E F I B I D T I O T H Y M D G I I

图 3B(2)

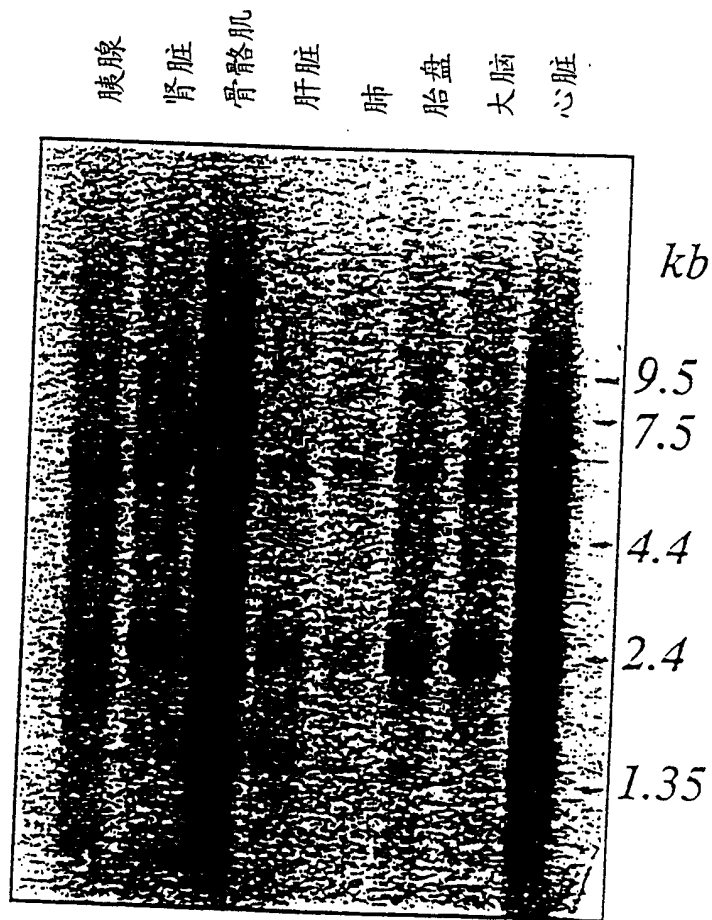


图 4(A)

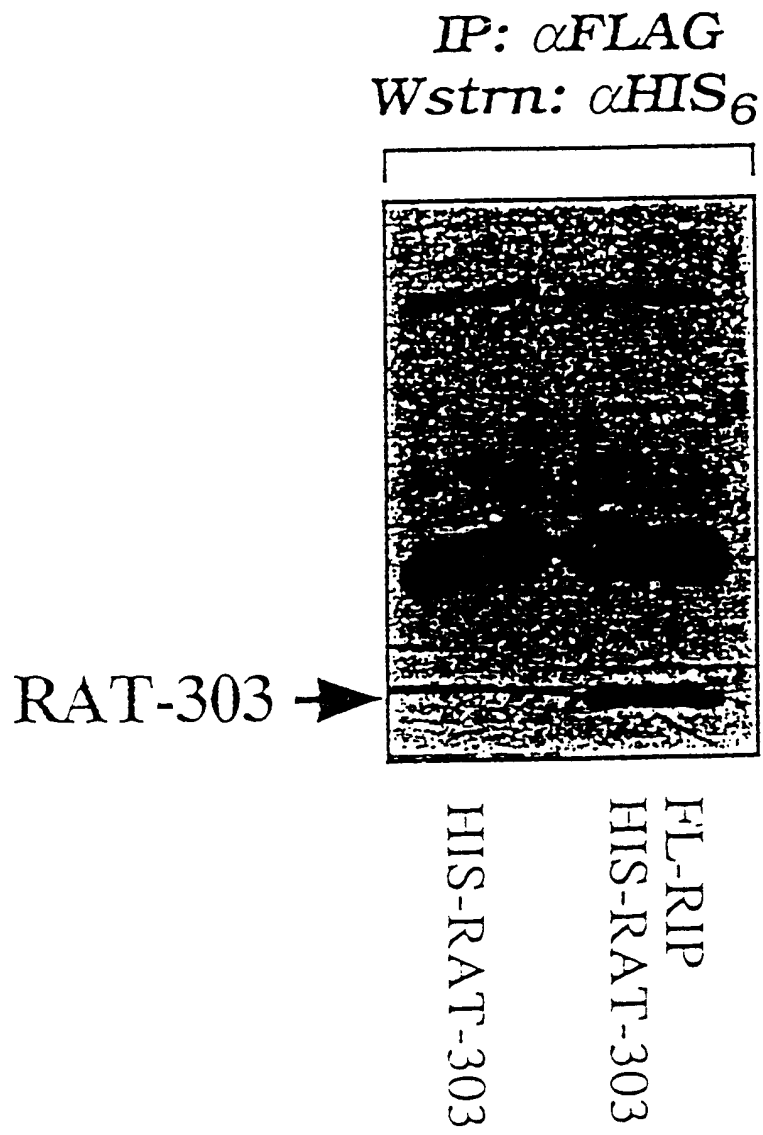


图 4(B)

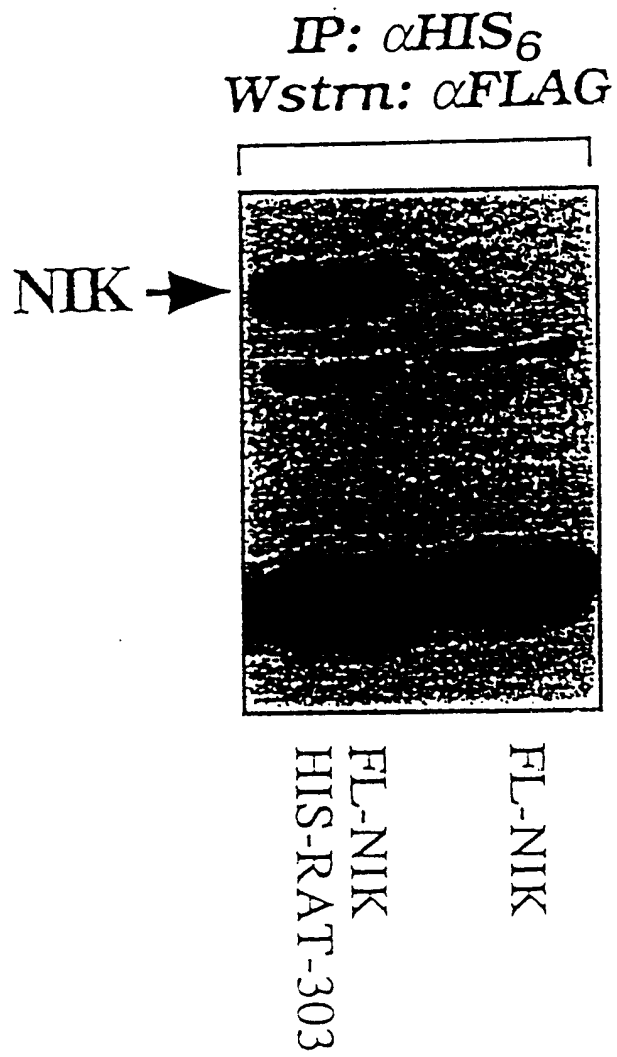


图 4(C)

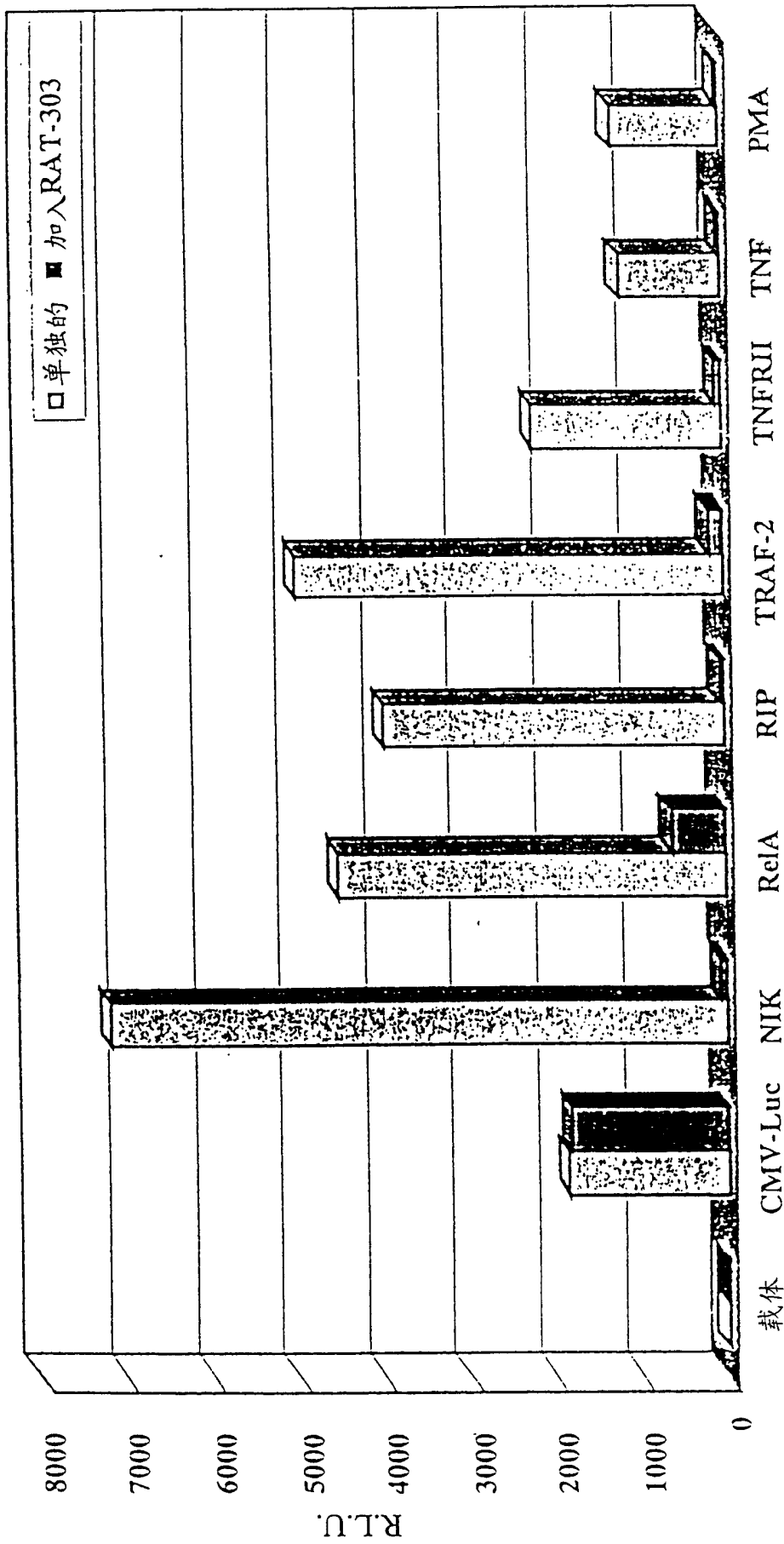


图 5(A)

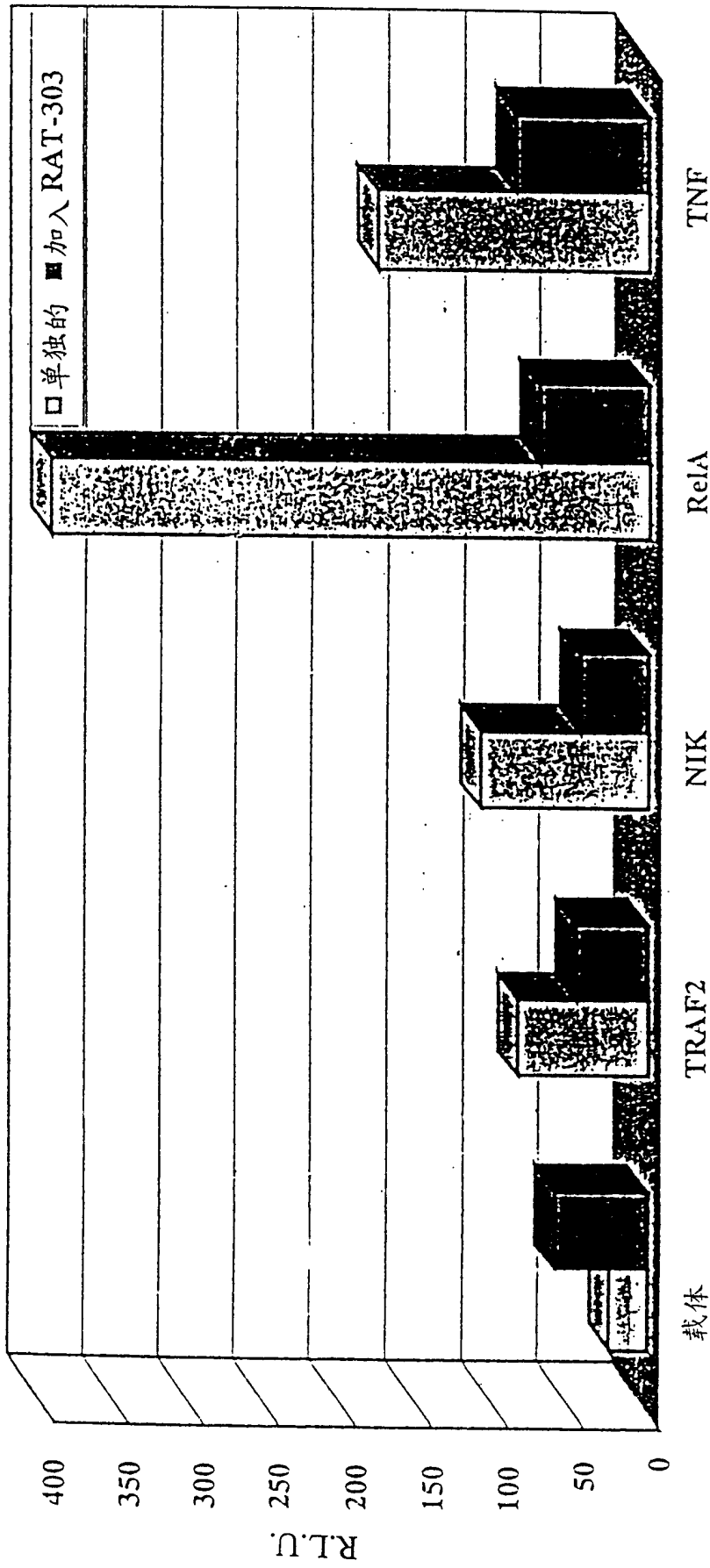


图 5(B)

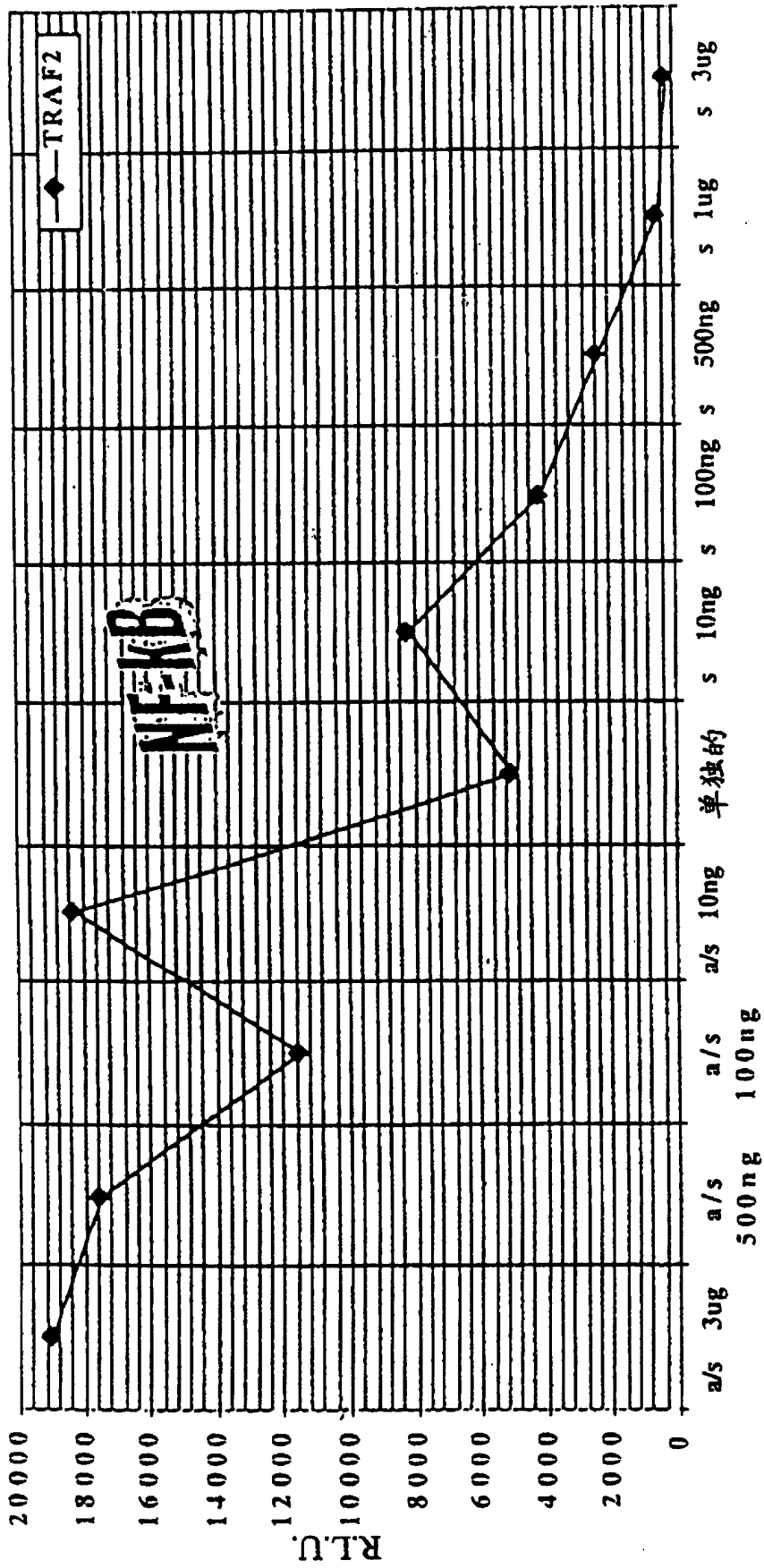


图 6(A)

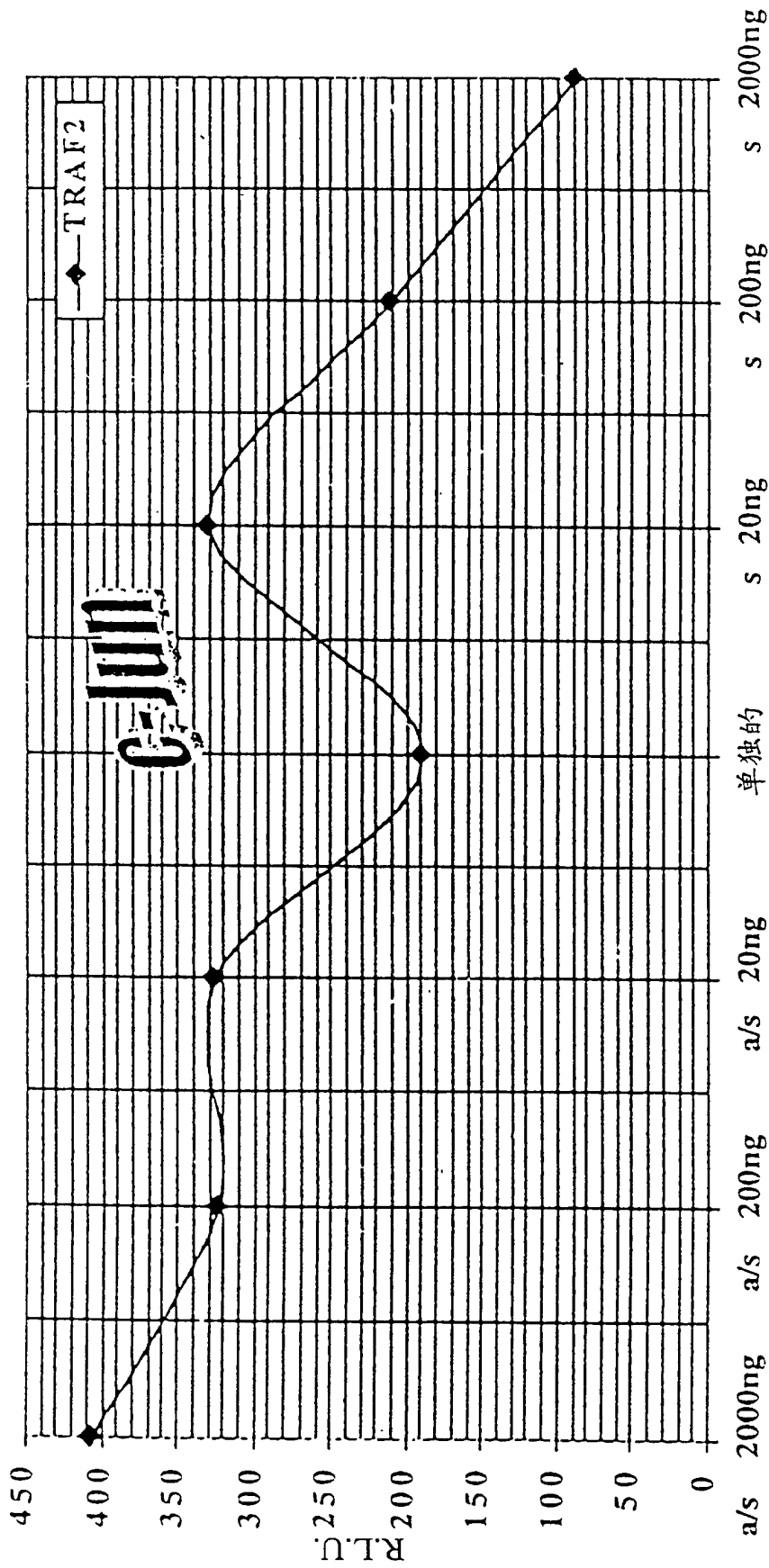


图 6(B)

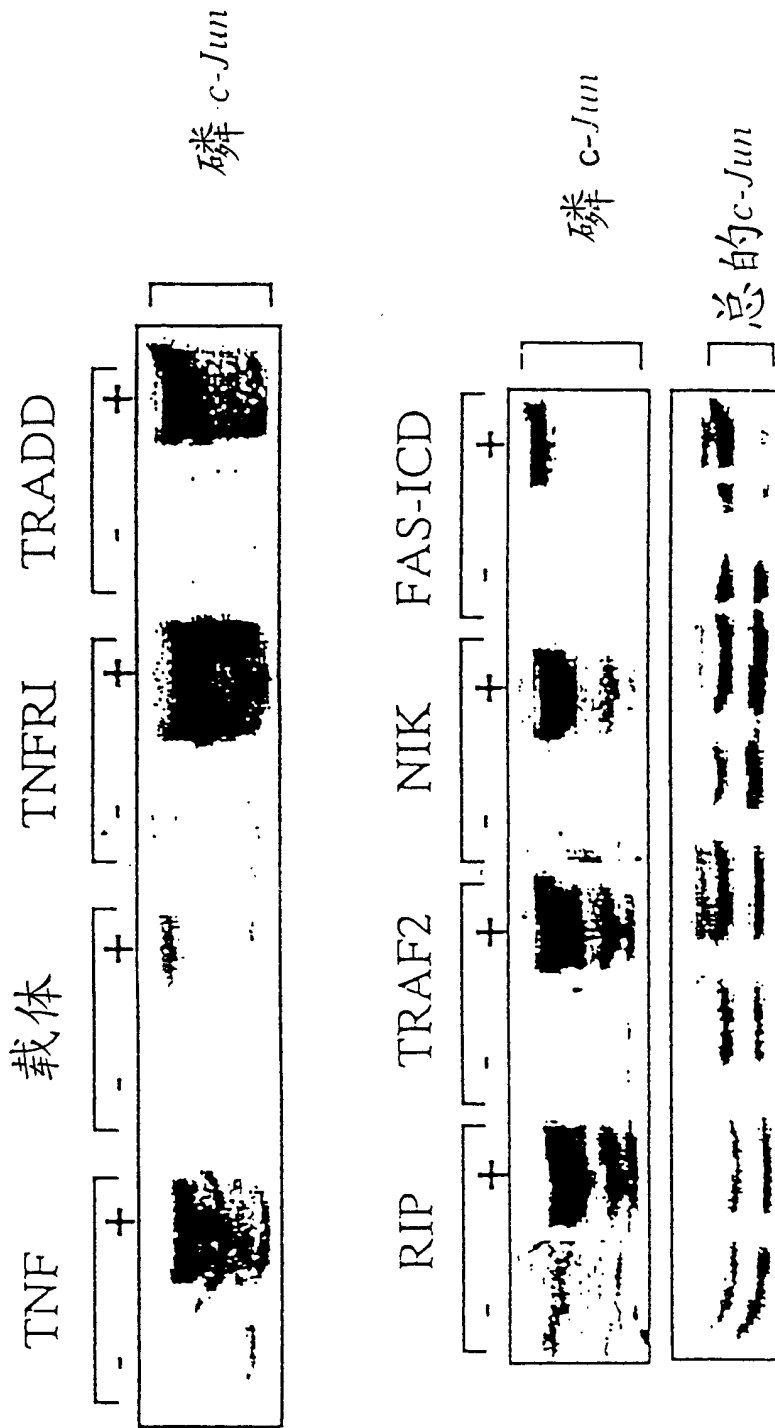


图 7(A)

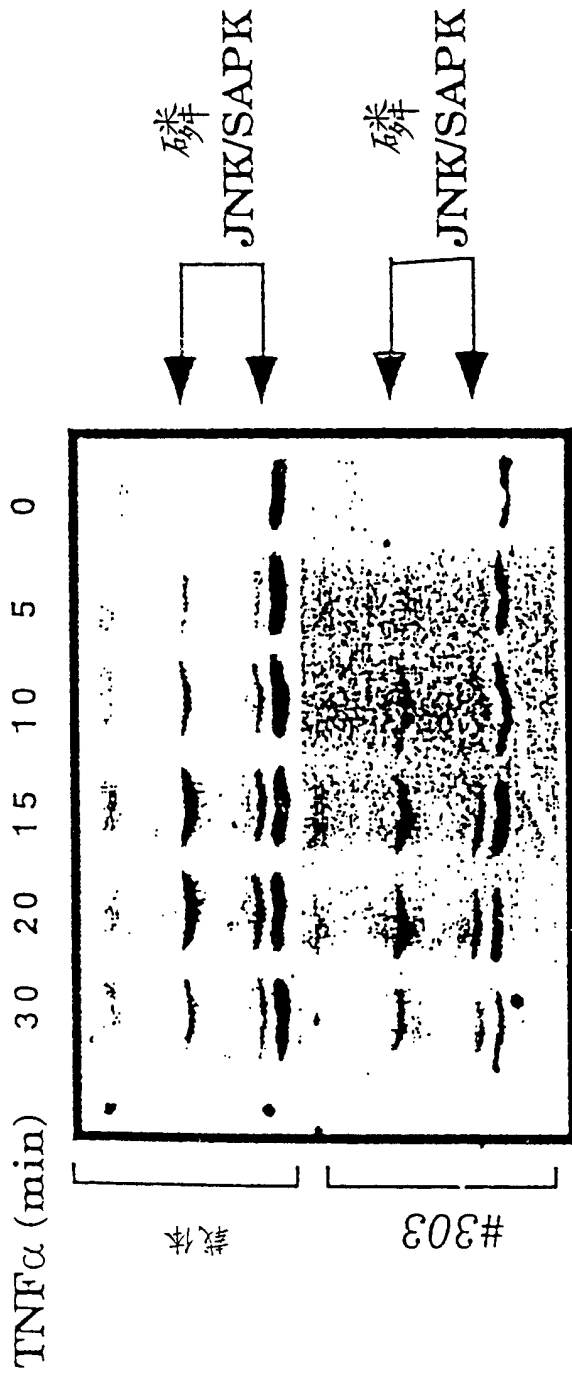


图 7(B)

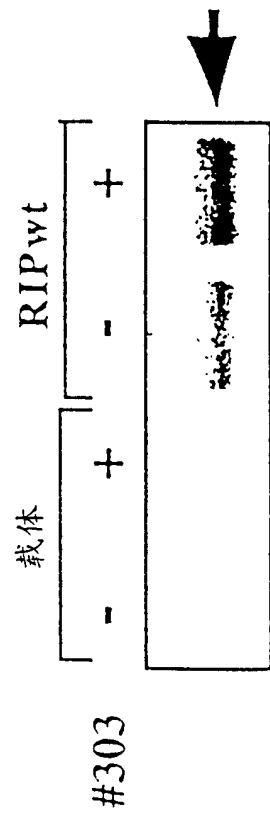


图 7(C)

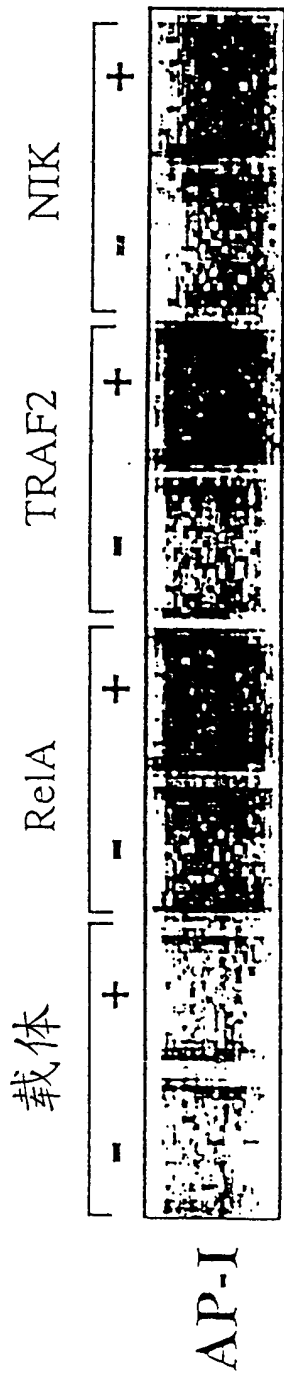


图 8(A)

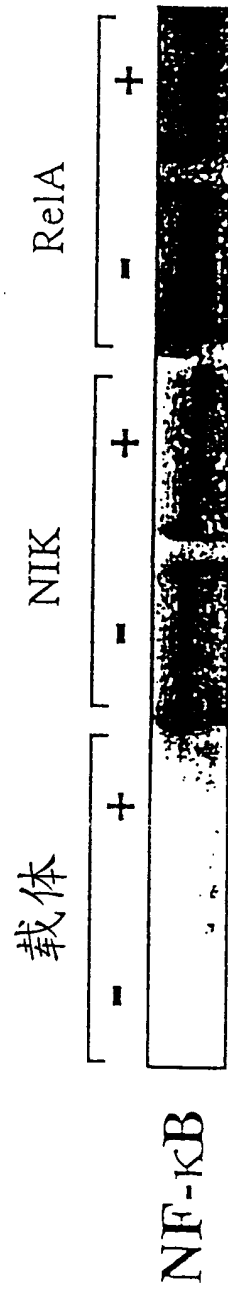


图 8(B)

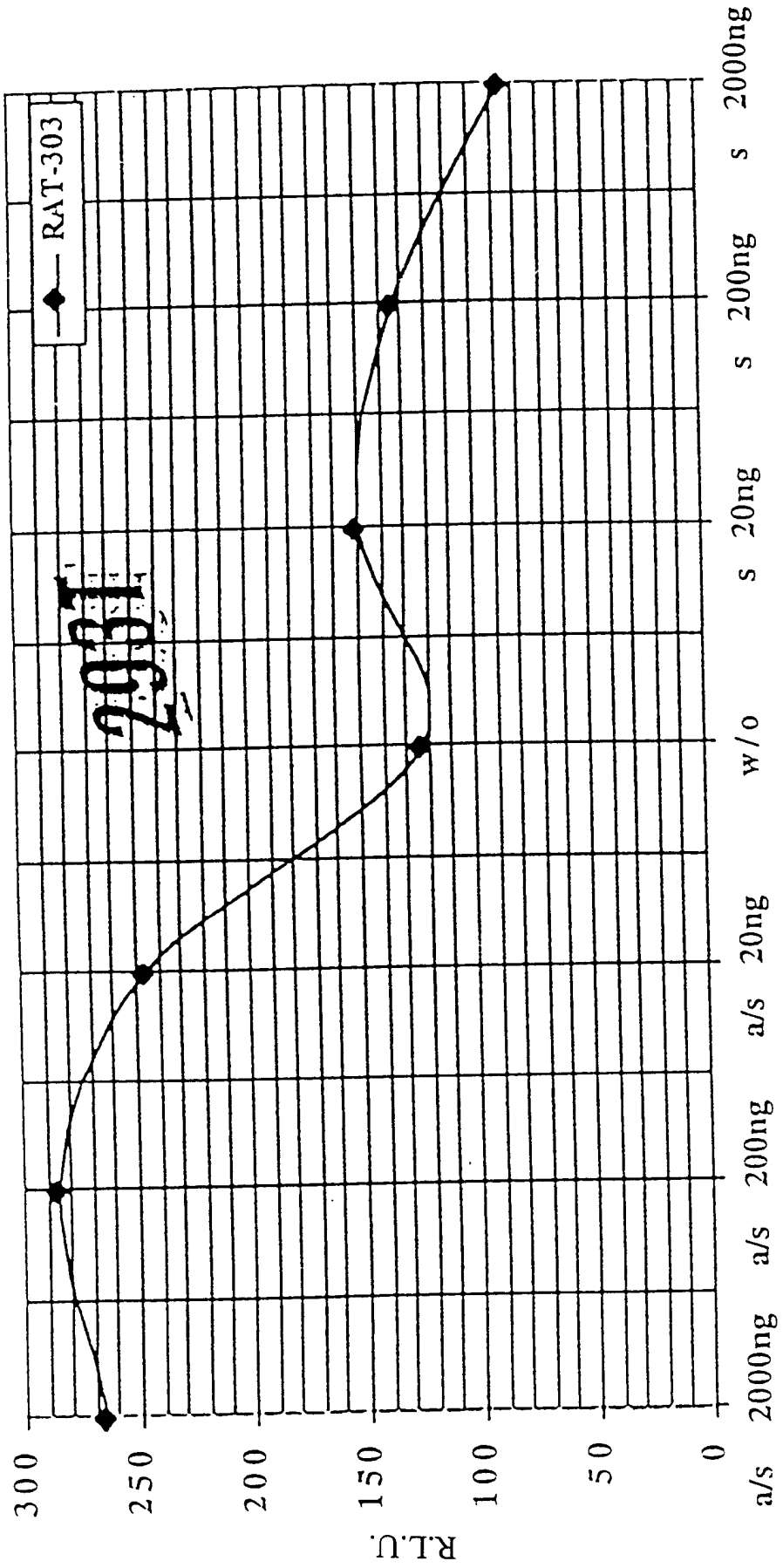


图 9(A)

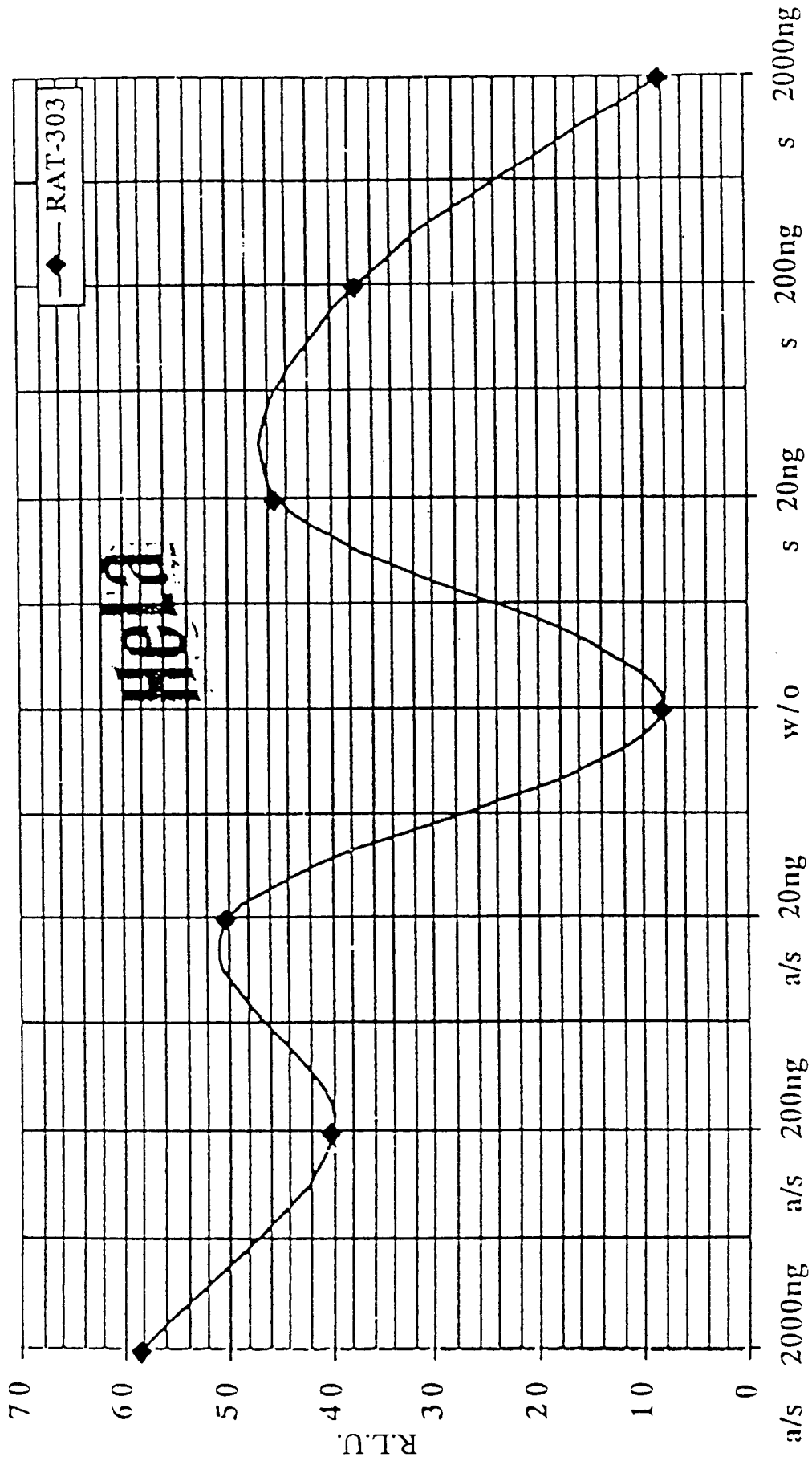


图 9(B)

克隆#10的核苷酸序列

```

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100
1 GCCACGAGG CCCAGACTTT GACCGTTCTT CACCACCCT CCAGCCTCCT CCTGTGAACT CACTGACCAC CGAGAACAGA TTCCACTCTT TACCATTTCAG 100
101 TCTCACCAAG ATGCCCAATA CCATGGGAA TATTGGCCAC AGTCCACTTT CTCTGTCCAGC CCAGTCTGTA ATGGMAGAGC TAAACACTGC ACCCGTCCAA 200
201 GAGAGTCCAC CCTTGGCCAT GCCTCCCTGG GACTCACATG GTCTAGAGAT GGGCTCATTTG GCTGAAAGTGA AGGAGAACCC TCCYTTCTAT GGGGTAAATCC 300
301 GTTGGATCGG TCAGCCACCA GGACTGAAATG AAGTGTCCG TGGACTGGAA CTGGMAGATG AGTGTCCAGG CTGTACGGAT GGMACCTTCA GAGGCACTCG 400
401 GTATTTCACC TGTGCCCTGA AGMAGCCGT GTTTGTGAA CTGAMAGACT GCAGGCCCTGA CTCTAGGTTT GCATCAITTC AGCCGGTTTC CAAATCAAGAT 500
501 TGAGCCCTGT AACTCTTTAG CATTGGAGG CTACTTAACT GAAGTAGT:G AAGMAATAC T:CCA:CCM AANTGGAAA AGMIRGTTG GAGATAATGA 600
601 TTGGGGMAG AAGMAGGCA TCCAGGGTC AATPACAAATC TTGKTACTTA G:ACTCAACC TTATTCIKGC TTATTTIKGCT TTTAGTTCIG TTTCTINGGACA 700
701 CTGGTGTAC TTTAGACCC AAGAMAMAG AAACGNIGTT AGATATTTW WKWHMACCC AAGACTACT GAGCACAGA ATTGTAAATC CTCIGAGAAAT 800
801 ATATGGATAT GTGTGTCCA CAAANTTAT GAACCTGAGG AAAATACTTG AAAGGTGGA GGCTGCATCA GGATTTACCT CTGAAGAAA AGATCCTGAG 900
901 GAATTCCTGA ATATTCGTGT TCAATCATTT TTMGGGTAG AACCTTTGCT AAMATAAGA TCAGCAGGTC AAMAGTACA AGATTGTTAC TTCATATCAA 1000
1001 TTTTATGA AAMAAATGAG AAAGTTGGC TTCCACANT TCAGCAGTTG TTAGNATGTT CTTTTATCAA CAGTAACCTG AAATTTGCAG AGGCACCATC 1100
1101 ATGTCATGAT ATTCAGATGC CTCGATTTGG AAMAGACTTT AACTATTTA AAAATTTTTT CCTTCTCIGG AATTAGATAT AACAGNTTAA CTTGAAGACA 1200
1201 CCCACAGAC TGCCGGATAT GTGGAGGCT TGCAATGTAT GAGTGAAGA ATGCTACGAC GATCCGGACA CCAGCTGGA AAACAAGCAG TTTTGTAAAA 1300

```

图 10(A)

```

1301 CC'IGCAACAC TCAAGTCCAC C'TTCATCCGA AGAGGCTGMA TCATAMATAT AACCCAGTGT CACTTCCCA AGACTTACCC CGACTGGGAG ATTGGAGACA 1400
1401 CGGCTGCATC C'CTTGGCAGA A'ATGGAGIT A'ATTTGCTGTT C'TCTGCATAG AACAMGCCA CTATGTTGCT TTTGTGAAGT ATGGGAMGGA CGAT'CTGCC 1500
1501 TGGCTCTTCT T'TGGACAGCA TGGCCGATCC GGGATGGTGG TCAGAMTGGC TCANCAATTC CCCAAGTCHC CCHTGSCCCA GAAGTAGGAG AGTACTTGGGA 1600
1601 AGATGCTCTCC TGGMAGACCC TGSAMTYCCT TGGACTCCCA GGAGMATCCC AAGGCTGTGC ACGMAGCTG CTTTGTGATG CCATATATGT GCCATGTACC 1700
1701 CAGAGTCCAA CAATGAGTIT GTACAMATAA CTGGGGGTCA TCGGGAMAGG CAANGAACT GGMAGGCAGA GTCCCTAACG TTGCATCTTA TTCCGGAGCTG 1800
1801 GCAGTCTCTGT TCACGGTCCA TTGCCGGCMA TGGATGTCIT TGTGGTGATG ATCCTTCAGA AAAGGNTGCC TCTGTTTAMA AACAAATGTC TTTTGTGTCC 1900
1901 CTGAAGTATT TAAATMGAAG CAATTTGCAC TCTAGAMAGT ATGTTTGTGT TGGTTTTTA AGAAGTCTAA ATGAAGTTAT TAATACCIGA AGCTTTAAGT 2000
2001 TAAGTGCATT GATCATATGA TATTTTGGGA AGCATACMAT TTTAATTTGT GAAGTTTAMA GCCCTTTTTA GTCCATTGAG AATGTAMATA AATGTGTCTT 2100
2101 CTTTATGGAA AAAAAA
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100
2116

```

图 10(B)

RAT-303

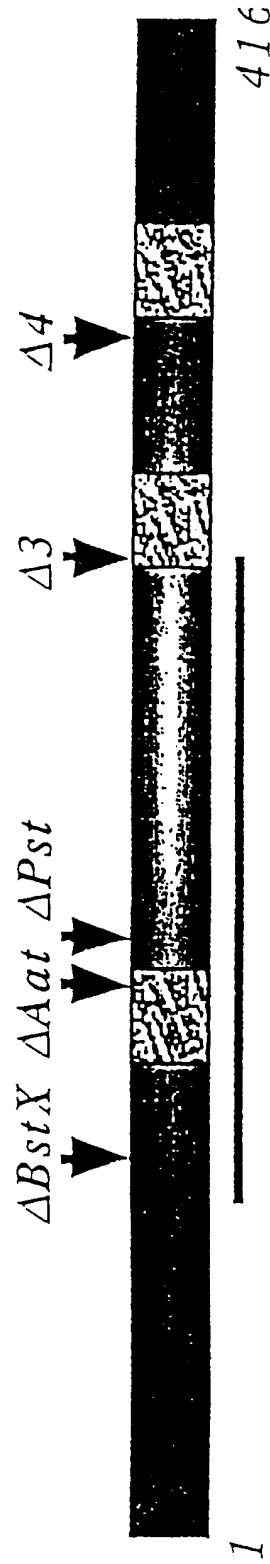


图 11(A)

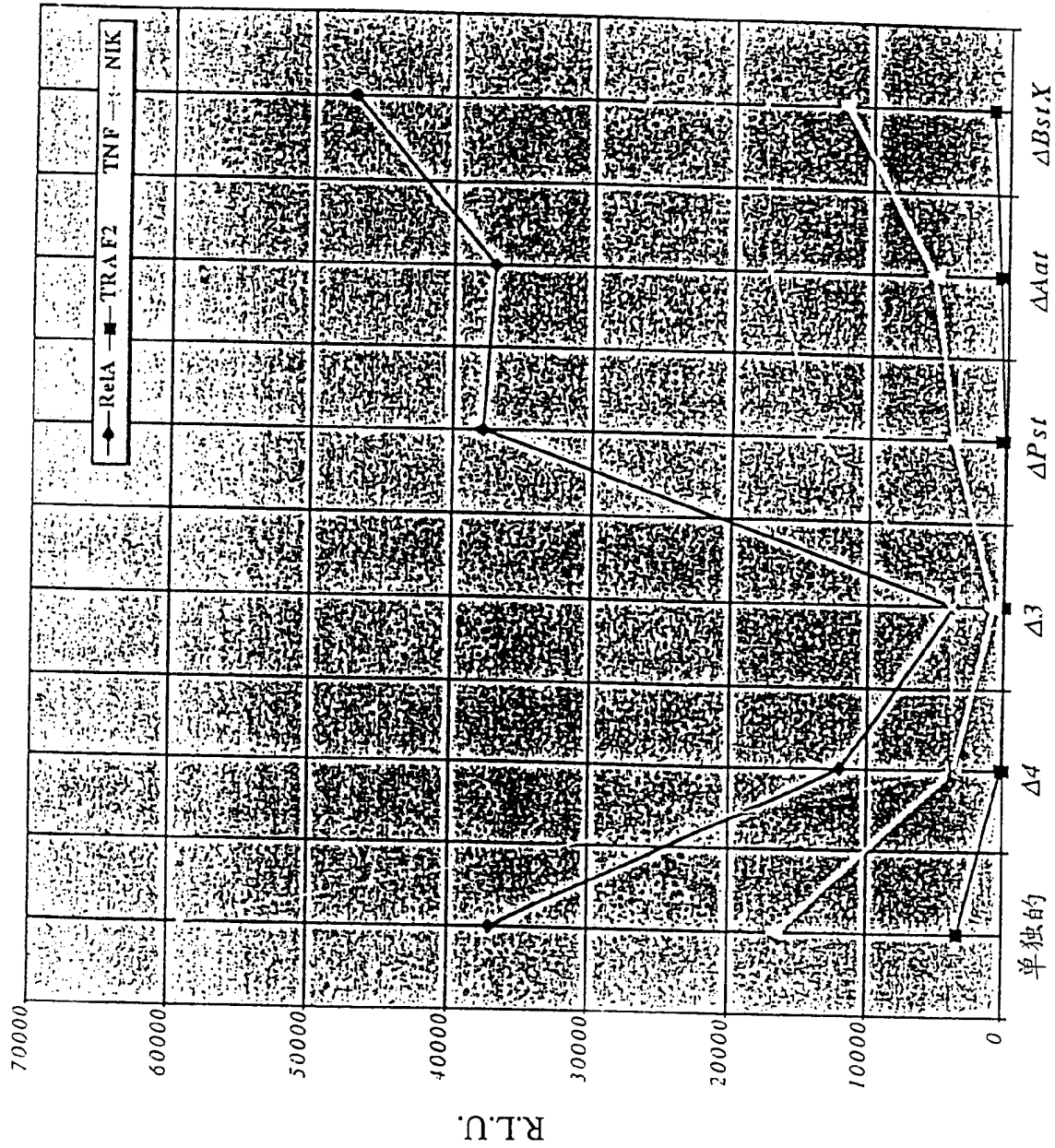


图 11(B)

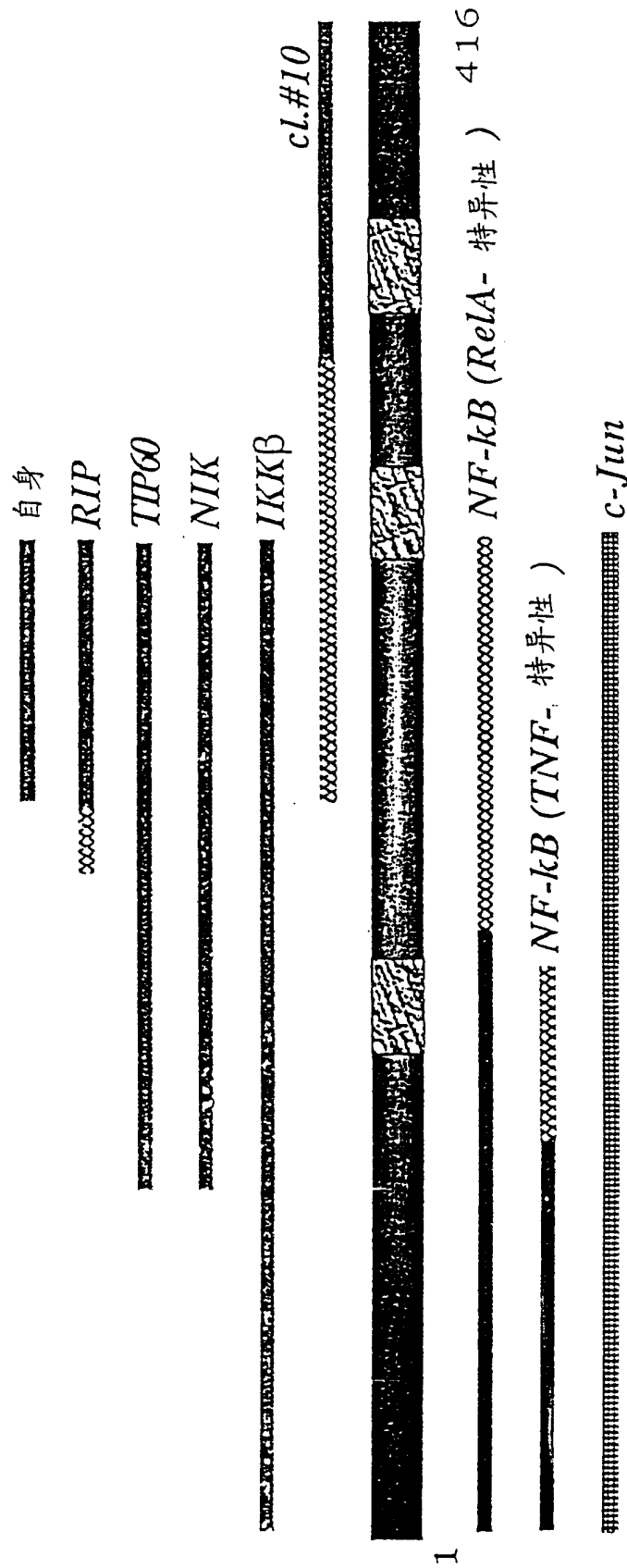


图 12(B)

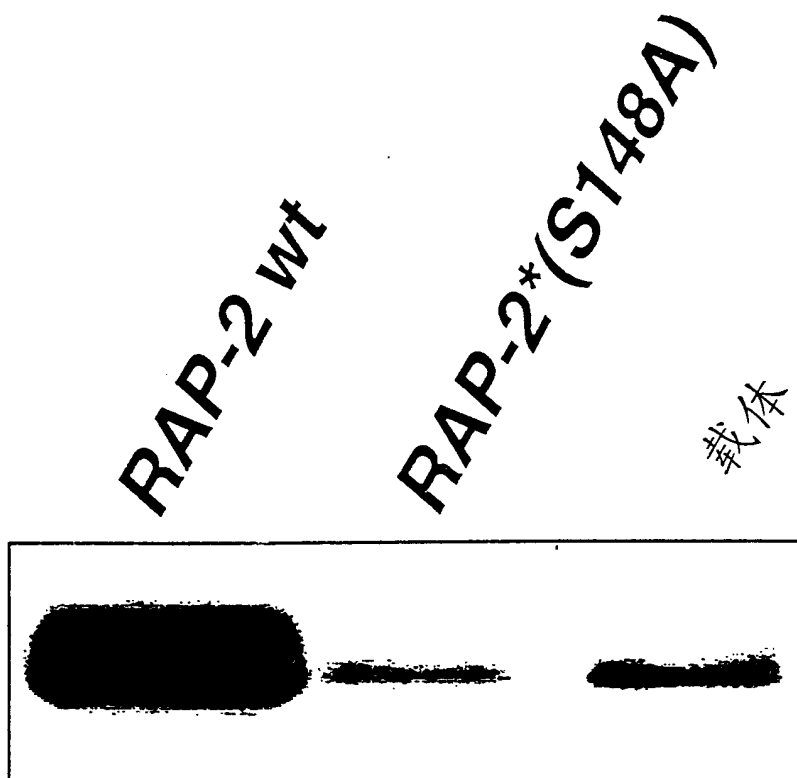


图 13