[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
C12N 15/12
C12N 15/63 C12N 1/15
C12N 5/12 C07K 16/00
C07K 16/42

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96191059.3

[43]公开日 1997 年 11 月 19 日

[11] 公开号 CN 1165537A

[22]申请日 96.7.17

[30]优先权

[32]95.7.17 [33]US[31]08/503,172

[86]国际申请 PCT/US96/11857 96.7.17

[87]国际公布 WO97/04096 英 97.2.6

[85]进入国家阶段日期 97.5.12

[71]申请人 艾科斯有限公司

地址 美国华盛顿州

[72]发明人 罗伯特·欧文·洛克比

亚当·卡西西恩

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 温宏艳

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 新的PKA-结合蛋白及其用途

[57]摘要

本发明提供了新的 PKA-结合多肽，编码此多肽的核酸和与多肽有特异免疫活性的抗体。

权　利　要　求　书

1. 一种纯化和分离的聚核苷酸，它包含陈述于 SEQ. ID. NO:5 的蛋白编码序列。

2. 权利要求 1 的聚核苷酸，它是一个 DNA 分子。

3. 权利要求 2 的 DNA 分子，它是一个 cDNA 分子。

4. 权利要求 2 的 DNA 分子，它是一个基因组 DNA 分子。

5. 权利要求 2 的 DNA 分子，它是一个全部或部分化学合成的 DNA 分子。

6. 一种纯化和分离的聚核苷酸，它选自：

a) 陈述于 SEQ ID NO:5 的人类 DNA 序列，和

b) 在严格条件下与 a)的 DNA 的非编码链杂交的 DNA 分子。

7. 一种 DNA 表达构建物，它包含根据权利要求 2 的 DNA 分子。

8. 一种用根据权利要求 2 的 DNA 分子转化的宿主细胞。

9. 一种用于产生由陈述于 SEQ. ID. NO:5 的聚核苷酸编码的人类多肽的方法，它包含在一合适培养基中生长根据权利要求 8 宿主细胞和从所说的宿主细胞或其生长培养基中分离多肽。

10. 一种由陈述于 SEQ. ID. NO:5 的聚核苷酸序列编码的纯化和分离的多肽。

11. 一种能够特异地与权利要求 10 的多肽结合的多肽。

12. 一种根据权利要求 11 的多肽，它是一个抗体。

13. 一种根据权利要求 12 的抗体，它是一个单克隆抗体。

14. 一种对权利要求 13 的抗体特异的抗个体基因型的抗体。

15. 一种产生权利要求 13 的抗体的杂交瘤细胞株。

说　明　书

新的 PKA - 结合蛋白及其用途

发明领域

本发明一般涉及到结合蛋白激酶 A 的蛋白。更特别地，本发明涉及新的蛋白和编码那些仅限于细胞内蛋白激酶的蛋白的核苷酸序列。

发明背景

细胞外信号如激素和细胞因子，通过激活腺苷酸环化酶、增加细胞内的 cAMP 水平并最终激活 cAMP - 依赖的激酶（ PKA ）来调节许多细胞过程。 PKA 是一普遍存在的酶，它在许多细胞内通路起作用，例如，通过糖源磷酸化酶的可逆磷酸化作用[Walsh 等， J. Biol. Chem., 243: 3763-3765(1969)]，调节糖原代谢，以及通过抑制 Ras 对 Raf-1 的激活[Vojtek et al ., Cell, 74: 205-214 (1993) and Hafner et al., Mol. Cell Biol.,14: 6696-6703(1994)]来调节 MAP 激酶信号。无活性的 PKA 以四聚体存在，其中两个相同的催化亚基结合在两个调节亚基的二聚体上。 cAMP 引起的 PKA 激活是通过 cAMP 分子结合到每个调节亚基（ R ）上，使激活的催化亚基（ C ）释放而起作用的。虽然已鉴定仅一种形式的 C 亚基，但存在两类 R 亚基， RI 和 RII，具有明显不同的亚细胞分布。据报道 RI 同型（ RIα 和 RIβ ）主要是胞浆的，并在核外，而 RII 同 I 型（ RIIα 和 RIIβ ）的 75 % 为颗粒的， 并与质膜、细胞骨架成分、分泌颗粒、高尔基器、中心体或可能细胞核结合[Scott, Pharmac. Ther. 50:123-145(1991)]。不同 R 亚基的差异（物理的或生理的）大概提供了一种使细胞能限制 C 亚基活性向所期望通路的方法。

最近的证据表明细胞能通过在可能的底物附近定位无活性酶以把 PKA 活性作为目标，从而通过 cAMP 结合到 R 亚基，限制释放后的 C 亚基活性。此“隔室化”将 PKA 与信号通路中的参加者隔离，并有助于 PKA 对不同细胞外刺激反应的专一性。 PKA 的隔室化至少部分通过 R 亚基与特异蛋白的相互作用或束缚而发生，该特异蛋白将无活性的全酶定位或锚着在细胞内的特异部位。特异地隔离 PKA 的蛋白被叫做激酶 A 锚着蛋白或 AKAPs [Hirsch et al., J. Biol. Chem., 267: 2131-2134(1992)]。鉴于一些 AKAP 显示除与 PKA 外还结合和锚着其它蛋白这一事实，该蛋白家族被统称为锚着蛋白。

现在已经鉴定了许多锚着蛋白[下面讨论]它们明显地通过包含一个两亲性螺旋区域的普通羧基末端二级结构基元来结合 PKA [Scott and McCartney, Mol. Endo., 8: 5-11 (1994)]。 PKA 与大多数，假如不是全部的话，鉴定的锚着蛋白的结合能被模拟该普通二级螺旋结构的肽（ Ht31 ）阻断，而突变 Ht31 肽对 PKA/锚着蛋白结合没有影响，该肽含有一个破坏肽的螺旋性质的单个氨基酸替换[Carr et al., J. Biol. Chem., 266: 14188-14192 (1991)]。即使 PKA/锚着蛋白相互作用受一种普通二级结构的影响，但锚着蛋白（或在不同种属中发现的同源锚着蛋白）一般具有独特的一级结构，如已在多种生物体中鉴定的数目不断增加的锚着蛋白所证实的。大概这种独特的氨基酸结构，最值得注意的是蛋白的氨基末端区域，是针对多种特定细胞类型鉴定为唯一的锚着蛋白以及已观察到 PKA 定位的多种特定细胞内隔室的部分原因。

比如，主要在哺乳动物脑中表达的锚着蛋白已在大鼠（ AKAP 150)和牛（ AKAP 75)中[Bergman, et al., J. Biol. Chem., 266: 7207-7213 (1991)]以及人（ AKAP 79 ）中[Carr et al., J. Biol. Chem., 267: 16816-16823 （ 1992 ）]鉴定。这些神经元特异的蛋白之间氨基酸同一性和免疫交叉反应性暗示它们表现为种间同系物。另一个例子，（ AKAP 100 ）似乎对人和大鼠的心肌和骨骼肌是特异的，而在这些哺乳动物的脑细胞中表达为较低程度。还有一个例子， AKAP Ht31 [Carr et al., J. Biol. Chem., 267: 13376-13382 （ 1992 ）]似乎对甲状腺细胞是特异的。相反地， AKAP 95 已显示在多种细胞类型中表达，表明无显著的组织或细胞类型特异性。

关于在特异的细胞内隔室的定位， AKAP 75 ，微管结合蛋白（ MAP-2 ）[Threurkauf and Valee, J. Biol. Chem., 257: 3284-3290 (1982) 和 DeCamilli et al., J. Cell. Biol., 103: 189-203 (1986)] , AKAP 79 [Glantz et al., J. Biol. Chem., 268: 12796-12804 (1993)] 和 AKAP 150 [Glantz et al., Mol.. Biol. Cell, 3: 1215-1228 (1992)]与细胞骨架结构蛋白紧密连接， AKAP 75 更特异地与突触后密度相关[Carr et al., J. Biol. Chem., 267: 16816-16823 (1992)]。还有其它的锚着蛋白显示定位在较少分布的细胞结构，包括 AKAP 350 与中心粒结合[Keryer et al., Exp. Cell Res., 204:230-240 (1993)], AKAP 100 与大鼠心脏组织的肌浆网结合[McCartney, et al., J. Bio. Chem. 270:9327-9333 (1995)]以及一种 85 kDa

AKAP，它连接 PKA 到高尔基体上[Rios et al., EMBO J., 11:1723-1731 (1992)]。

具有明显锌指 DNA 结合区的 AKAP 95 似乎存在于核的外面[Coghlan et al., J. Biol. Chem., 269:7658-7665 (1994)]。AKAP 95 的 DNA 结合域使 PKA 直接参与基因转录，可能通过 PKA 的定位 于转录因子磷酸化。受锚着蛋白/PKA 结合影响的其它各种各样的细胞活性已通过破坏相互作用而被证明，如在 T 细胞中破坏 PKA/锚着蛋白结合已显示逆转 cAMP 诱导的白介素 2 表达的抑制[Lockerbie et al., J. Cell Bio Chem., Suppl. 12A: 76, Abstract D2155 (1995)]，并且在海马神经元中 PKA/锚着蛋白结合的破坏已显示减弱通过α－氨基－3－羟基－5－甲基－4－异噁唑丙酸/kainate 谷氨酸受体的整个细胞过程[Rosenmund et al., supra.]。锚着蛋白调节 IL-2 表达及调节谷氨酸受体活性的能力，同前面证明的锚着蛋白可结合神经钙蛋白提示锚着蛋白和调节锚着蛋白结合到细胞成分上的分子的多种治疗应用。

鉴于细胞表达类型，亚细胞定位和已鉴定的锚着蛋白的生理活性的差异，技术上需要继续鉴定新的锚着蛋白和编码它们的核酸。锚着蛋白一级结构的独特性为特异地调节 PKA 定位及其在特定细胞过程起作用提供了靶点。

发明概述

本发明提供了编码具有结合 PKA 生物性质及亚细胞隔室化的蛋白纯化和分离的多核苷酸序列。现在优选的多核苷酸在 SEQ ID NO:5 中列出。本发明的多核苷酸还包含在对 SEQ ID NO:5 的多核苷酸严格的杂交条件下杂交的多核苷酸。本发明的多核苷酸可以是 DNA 或 RNA，可与 DNA 分子的正义链或反义链杂交。该 DNA 可是 cDNA，基因组 DNA 或化学合成的 DNA。本发明的多核苷酸可以通过标准技术如互补，低严格杂交以及用根据本发明多核苷酸序列的了解所产生引物的 PCR 来鉴定。

本发明还提供重组表达构建物，包含将本发明的多核苷酸可操作地连接到转录调节元件如启动子和转录终止子上。该转录调控元件可以是同源的或异源的。

本发明的另一方面是用本发明的多核苷酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞可以是原核的或真核的。如此转化或转染的宿主细胞对本发明

PKA 结合多肽的表达特别有用，这些多肽可从细胞或其培养基中分离到。

本发明还有一个方面是由本发明的多核苷酸编码的 PKA 结合多肽。优选的 PKA 结合多肽由前面 SEQ ID NO:5 的多核苷酸编码。本发明的多肽可从天然来源纯化或用本发明的宿主细胞通过重组方法生产。保留野生型多肽生物活性的变异体多肽也被考虑，包括其中已参入了增加、消除或保守氨基酸替换以调节 PKA 结合多肽的功能或免疫学特征的类似物。其它变异体多肽包括融合蛋白，其中参入增加的多肽序列以利于纯化或在试验支持物上固定。本发明的增加多肽可通过与 SEQ ID NO:5 的多核苷酸编码的多肽免疫交叉反应性来鉴定。

本发明还提供特异地与上述 PKA 结合多肽结合的多肽及非多肽分子。优选的结合分子包括抗体（如多克隆，单克隆，重组抗体或其结合片段）。结合分子对于 PKA 结合多肽的纯化，表达 PKA 结合蛋白的细胞的鉴定以及调节 PKA 和 PKA 结合多肽在体内的相互作用是有用的。还提供了产生与本发明的 PKA 结合多肽特异性免疫反应的抗体的杂交瘤细胞株。这样的杂交瘤可通过技术上已知的技术生产及鉴定。

还提供了鉴定破坏 PKA 与本发明的 PKA 结合蛋白相互作用的分子的测定方法（如固定化结合试验，溶液结合试验，闪烁接近测定法，双杂交筛选试验等）。在一些情况下，可期望调节 PKA 和本发明间的结合。在其它情况下，有期望特异地调节 PKA 结合多肽和它所结合的细胞成分（不是 PKA ）之间的结合。在任何一种情况下，本发明的多肽为本发明的测定方法提供有用的筛选靶点。本发明的测定方法可以各种完成，包括基于细胞的试验如美国专利号 5,283,173 所述的双杂交筛选或专利合作协议（ PCT ）公布号 WO 91/16457 所述的互补试验。这种类型的试验对评价化合物的细胞内效能特别有用。本发明不基于细胞的试验包括闪烁接近测定法， cAMP 竞争试验， ELISA 试验，放免试验，化学发光试验等。这些实验步骤为技术上已知的，而且被广泛描述，如在 Boudet et al., J. Immunol. Meth., 142: 73-82 （ 1991 ）； Ngai et al., J. Immunol. Meth.,158: 267-276 (1993) ; Pruslin et al., J. Immunol. Meth., 137: 27-35 (1991); Udenfriend et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8672-8678 (1985); Udenfriend et al., Anal. Biochem., 161:494-500 (1987); Bosworth and Towers, 自然, 341:167-168 (1989); Gilman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,

67:305-312 (1970); and U. S. Patent No. 4,568,649。调节锚着蛋白结合的化合物的用途是明显的。例如，小分子可能被发现抑制 PKA/锚着蛋白结合或锚着蛋白与特异细胞成分相互作用。这种类型的调节子（ modulator ）可能使 PKA 的特异库移位，并只影响靶信号通路。与其它细胞成分结合的锚着蛋白的调节子的鉴定可能同样有益。例如，以与先前鉴定的免疫抑制剂相似的方式，但具有较少副作用的影响神经钙蛋白活性的因子对于治疗现在使用毒性更多免疫抑制剂的病症是有用的。此外，调节参与细胞活性的锚着蛋白的因子的鉴定对替代目前承认的治疗妨碍也许有用。例如调节 IL-2 表达的锚着蛋白调节的因子对替代外源性重组 IL-2 的服用可能是有用的。

发明详述

下列实施例通过解释而非限制的方式提供。实施例 1 写有来自人 cDNA 库的 T 细胞特异的锚着蛋白的鉴定。实施例 2 描述鉴定的锚着蛋白的 RII 结合特异性。实施例 3 涉及锚着蛋白核苷酸序列的确定。实施例 4 写有锚着蛋白克隆的表达。实施例 5 涉及锚着蛋白的细胞及组织分布。实施例 6 描述锚着蛋白和调节锚着蛋白结合的分子的可能的治疗用途。

实施例 1

T 细胞表达的锚着蛋白的鉴定

为了鉴定新的 T 细胞锚着蛋白，亚克隆到 ZAPII 表达（ Stratagene, La Jolla, CA ）的人 Jurkat T 细胞 cDNA 文库经 Carr et al., J. Biol. Chem., 267: 16816-16823 (1992)描述的 RIIα 涂盖技术筛选。

简要地， 1ul 文库噬菌体（ 5×10^4 pfu ）加入 10mM $MgSO_4$ 中生长至 OD_{600} = 0.5 的 600μl 大肠杆菌株 XL-1 Blue MRF′（ Stratagere ）。细菌和噬菌体在 37 ℃温育 15 分钟，然后 7.5ml 顶琼脂（ NZY 培养基(1% [w/v] N － Z －胺 A 型， 1.5%[w/v]酵母提取物， 86mM NaCl, 8M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$， 1.5%[w/v]细菌培养用琼脂， pH7.5 ）， 0.7%琼脂糖）加入悬液中。得到的混合物立即在预热至 37 ℃的 NZY 平板上铺板。平板冷至室温并在 42 ℃温育 4 小时。预浸于 10mM 异丙基－ 1 －硫－β － D －半乳糖苷（ IPTG ）的硝酸纤维素膜置于平板上，该平板再在 37 ℃保温 4 小时。移开滤膜在 TBS （ 50mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl ）中洗 3 次，并在 4 ℃封闭液（ TBS， 5 % 脱脂牛奶， 0.1%BSA ）中封闭过夜。

第二套类似制备的硝酸纤维素膜铺在平板上，并在 4 ℃保温过夜。该滤膜被洗涤（如上所述）并在室温封闭一小时（如上所述）。

约 4μg (6μl) 重组鼠 RIIα 在含有 2.5μl[^{32}P]ATP (25μ Ci, 3000Ci/mmole)和 1μl 缓冲液（含 0.5μl MOPS, pH7.0, 0.5M NaCl, 20mM, $MgCl_2$ 和 10mM DTT ）的反应中与 2.35μg (0.5μl)重组牛 PKA 催化亚基混合。反应在 30 ℃进行 30 分钟，然后用 Execellulose GF-5 柱(Pierce)除去未参入的标记物。滤膜用[^{32}P]RIIα（ 100,000 cpm/ml 封闭液）在室温探测 6 小时。温育后该滤膜用含有 1 % Tween-20 的 TBS 洗 3 次，并对 X 光片曝光 16 小时。

在筛选的大约 1 × 10^6 噬菌体中，一用阳性斑 #11 噬菌斑被确定与标记的 RIIα 结合。用开始筛选中所述的技术，在#11 斑上进行第二次筛选，表明#11 斑的子代也能与放射标记的 RIIα 结合。

实施例 2

RIIα 与 #11 噬菌斑结合的特异性

鉴于前面报告，即肽 Ht31（ SEQ ID NO: 1 ）一般地能阻止 PKA 与锚着蛋白结合，并且如上述 Ht31 的脯氨酸突变体（见下面 SEQ ID NO: 2 ，其中脯氨酸替换以黑体和下划线表示出来）在平行实验中被确定不具有 RIIα 与#11 斑结合的特异性，在来得实验中 RIIα 涂盖在一种 Ht31 肽存在下进行。

Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-
Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala

(SEQ ID NO: 1)

Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-**Pro**-Val-
Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala

(SEQ ID NO: 2)

简要地，硝酸纤维素堆（ lifts ）如实施例 1 所述制备，只是得到的印迹噬菌斑堆（ lifts ）预先在室温于含 1μM Ht31 肽或脯氨酸突变 Ht31 肽的封闭液中孵育 15 分钟。预孵育后，滤膜如实施例 1 所述用[^{32}P]RIIα 探测，然后将滤膜进行放射自显影。

放射自显图显示 #11 斑预先与 Ht31 肽孵育阻碍[^{32}P]RIIα 的结合，

而与脯氨酸突变的 Ht31 肽预孵无作用。这些结果表明 RIIα 与#11 斑编码的多肽结合受#11 斑二级结构的影响，与先前鉴定的锚着蛋白所使用的相似。

实施例 3

#11 斑 cDNA 克隆

为了确定插入噬菌斑#11 的噬菌体的核苷酸序列并推断其编码蛋白的氨基酸顺序，根据制造商的指导用 Exassist/XLOLR 系统（ Stratagene ）将#11 噬菌斑的 cDNA 插入在体内切除。

简要地，从 NZY 平板取出#11 斑与 500μl SM 缓冲液（ 100mM NaCl， 8mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50mM Tris-Hcl pH7.5, 0.1%[w/v]明胶）和 20μl 氯仿混合。该混合物经混悬存于 4 ℃（噬菌体休克）。 XL-1 Blue MRF′和 XLOLR 细胞（均来自 Stratagene ）分别在 30 ℃的补充以 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、含 0.2% (v/v) 麦芽糖的 LBM 培养基中生长过夜。用 0.5ml 过夜培养物和 50ml LBM 培养基制备 1/100 稀释的 XL-1 Blue MRF′细胞，该稀释物于 37 ℃生长 2 - 3 小时至对数中期 XL-1 Blue MRF′细胞为（ OD_{600} = 0.2-0.5，或 XLOLR 细胞为 OD_{600} = 0.5-1.0 ）。培养物在 1500 × g 离心，得到的沉淀重悬于 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 至密度为 OD_{600} = 1.0。

200μl XL-1 细胞， 250μl 上述噬菌体贮存悬液和 1μl ExAssist 辅助噬菌体（ Stratagene ）混合并在 37 ℃孵育 15 分钟。加入 3ml LBM 培养基，培养物再在 37 ℃振摇孵育 2.5 小时。孵育后，混合物在 2000 × g 离心 15 分钟。回收上清，于 70 ℃保温 15 分钟，再 4000 × g 离心 15 分钟。得到的上清液含有将#11 噬菌斑 DNA 包装入噬菌粒 pBK-CMV 的丝状噬菌体。该噬菌粒通过将 10μl 噬菌粒贮存液与 200μl XLOLR 细胞（如上述制备）混合，并在 37 ℃孵育 15 分钟而获救。孵育后加入 300μl LBM 培养基，混合物再在 37 ℃孵育 45 分钟。得到的细胞悬液在含 50μg/ml 卡那霉素的 LBM 上以 200μl/平板铺板。

通过标准方法及包括使用 Wizard Miniprep 试剂盒（ Promega ）进行质粒制备。从#11 斑分离的质粒 DNA 称作克隆#11 。该 cDNA 插入片段通过用 EcoRI 和 BanHI 消化从载体上切下，得到的片段用琼脂糖凝胶电泳分离。克隆#11 插入片段测得为 2850 bp 长。克隆#11 的嵌套缺失（ nested deletion ）在除去 - 一个 - 碱基系统（ Promega, Madison, WI ）生成，而且克隆#11 用 Universal T3 （ ATTAACCCTCACTAAAG [SEQ ID

NO: 3]）和 T7（ GAT
ATCACTCAGCATAA[SEQ ID NO: 4]）引物及一种 Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle 试剂盒（ Perkin Elmer ）在 ABI 373 DNA 测序仪（ Perkin Elmer, Foster City, CA ）中被测序。

克隆#11 的 DNA 序列在 SEQ ID NO: 5 中列出。因为在核苷酸序列中没能发现合适的起始密码子，所以不可能确定克隆#11 的推断氨基酸序列和分子量。从 T3 引物得到的该序列核苷酸水平 Blast Search（ June 16,1995,14:01:37 EDT ）显示与称做“ Homo Sapiens cDNA 3′-end similar to none ”（登记号#T32770 ）的克隆有同源性，而从 T7 引物得到的序列数据显示克隆#11 以 1905 - 2248 的一段 343 个碱基与称做“ Homo Sapiens Partial cDNA 5′ -end similar to none ”（登记号#T31099 ）的克隆有 98 % 同源性，此外，克隆#11 在 2308 - 2640 核苷酸的一段 332 个碱基与称做“ Homo Sapiens Pautial cDNA, Sequence, Clone, 66D04（登记号#Z24883 ）的克隆具有 98 % 同源性。

实施例 4

克隆 #11 的表达

为了确定克隆#11 基因产物的近似分子量，克隆#11 在 XLOLR 细胞的过夜培养物（如实施例 3 制备）生长于 LBM 培养基/四环素（ 12.5μg/ml ），随后用于接种 250ml 相同的培养基。在 37 ℃孵育至 OD_{600} = 1.2，然后细菌以 600xg 离心 15 分钟。沉淀称重并重悬于 10 倍体积（ w/v ） FP 缓冲液（ 1 % Triton X-100， 150mM NaCl， 1mM EGTA， 1mM EDTA， 10mM Tris， pH7.4， 1 % 抑蛋白酶肽， 0.2% NaN_3 ）。细胞在 French Press 中破碎，裂解物通过 40000 × g 离心 30 分钟澄清。裂解液然后用 Centricon-10（ Amicon ）浓缩。一部分浓缩的裂解液上样到 10 % Tris-甘氨酸胶（ Novex ）上，电泳并转至 Immobilon（ Millipore ）。该印迹用[^{32}P]RIα 探测。发现了一条约 120KD 的带，它部分被 HT31 肽竞争掉。这些结果表明克隆#11 编码一种 PKA - 结合蛋白，它可被用于鉴定 PKA 结合多肽与 PKA 结合的抑制剂的测定方法中。

实施例 5

克隆#11 的细胞和组织分布

为了确定克隆#11 表达的细胞和组织分布，反转录酶 PCR （ RT-PCR ）被用来评价克隆#11mRNA 水平。

简要地，根据实施例 3 确定的核酸序列，开始设计的引物跨越克隆#11 序列的 300bp。在克隆#11 的序列（ SEQ ID NO: 5 ）中，引物 2T3 对应于 266 - 283 核苷酸，引物 M2T3 对应于 434 - 453 核苷酸，引物 R2T3 对应于 601 - 622 核苷酸，引物 R2T7 对应于 2229 - 2250 核苷酸，引物 M2T7 对应于 2337 - 2400 核苷酸，引物 2bT7 对应于 2256 - 2592 核苷酸， RNA 用 RNA 分离试剂盒（ Stratagene ）从不同类型的细胞和组织制备（在下面结果讨论中描述）。RT - PCR 进行如下。RNA（ 10μl 水中约 1μg ）首先在 80 ℃保温 3 分钟变性，然后置于冰中至下面的逆转录酶反应进行。变性 RNA 与 8μl 5 × MMuLV-RT 缓冲液（ Boehringer ），8μl 2.5mM dNTP 混合物，含有 2T3 和 R2T3 引物各 0.5μg 或 2bT7 和 R2T7 引物各 0.5μg 的 1μl 水， 1μl RNAse 抑制剂（ Boehringer ）， 1μl MMuLV-RT （ Boehringer ） 及 11μl 水混合，并在 42 ℃孵育 1 小时。

PCRs 执行如下。前面的逆转录酶反应 2μl 与 3μl 2.5mM dNTP 混合物， 3μl 10x Taq 聚合酶缓冲液（ Boehringer ）， 3μl (0.3μg) 2T3 引物与 3μl (0.3μg) R2T3 引物，或 3μl (0.3μg) 2bT7 引物与 3μl (0.3μg) R2T7 引物， 0.5μl Taq 聚合酶及 14.5μl 水混合。该混合物 94 ℃加热 4 分钟，然后完成 30 个循环（ 94 ℃ 1 分钟， 60 ℃ 1 分钟及 72 ℃ 1 分钟）。

PCRs 的扩增产物通过 1 % 琼脂糖电泳分离，然后用标准方法转至 Nytran Plus 膜（ s + s ）上。 PCR 产物通过 UV 照射交联到膜上，随后该膜在 42 ℃， 5 × SSPE， 0.5 % SDS, 0.1mM Tris， pH7.5 和 2 × Denhardt's 中预杂交 3 小时。

杂交探针用下面的末端标记制备。 2μl （ 200ng ） M2T3 引物与 2μl M2T7 引物（ 200ng ）， 2μl 10 × 多核苷酸激酶缓冲液（ Boehringer ），10μl ^{32}P-ATP （ 100μli， 3000Ci/mmole ）， 2μl （ 20 单位） T4 多核苷酸激酶（ Boehringer ）和 2μl 水混合。反应在 37 ℃进行 30 分钟，然后通过加入 2μl 0.5M EDTA 终止，未参入标记物通过用 Centristep 柱（ Princeto Separation, Inc. ）离心除去。膜然后在与预杂交液相同但加入 400ng ^{32}P-标记的 M2T3 和 M2T7 引物（各 200ng ）的杂交液中，于 42 ℃探测过夜。未交后膜室温下用 0.5 × SSC， 0.2% SDS 洗 3 次，每次 10 分钟，然后放射自显影。

基于细胞的结果表明，克隆#11 被 Ramos 细胞（ B 细胞）， Jurkat 细胞（ T 细胞）， U973 细胞（单核细胞）， T84 细胞（结肠癌）， HC60

细胞（早幼粒白血病）， A549 细胞（肺上皮）和 Hela（上皮癌）表达。组织分析结果表明克隆#11 在人睾丸、肝脏和大脑枕骨皮质表达。

实施例 6

可能的治疗应用

鉴于神经钙蛋白是两种有效的临床上有用的免疫抑制剂环孢霉素及 FK506 的靶物，它们都抑制神经钙蛋白活性，前面证明的 AKAP79 与神经钙蛋白结合是有重大意义的。如下所述，环孢霉素和 FK506 均对治疗多种疾病有用，但具有明显的限制性副作用。大概调节锚着蛋白/神经钙蛋白结合的因子最终以类似于环孢霉素或 FK506 的活性的方式调节神经钙蛋白活性。这样调节子的鉴定，特别是比那些观察到的其它免疫抑制剂具有较少副作用的调节子，可能对现在用环孢霉素或 FK506 治疗的多种疾病具有广泛的治疗用途。

已报道了环孢霉素和 FK506 的许多临床指征。例如，环孢霉素已经为移植后免疫抑制及使肝、肺、肠和胰移植成为可能确定了标准，虽然一般认为 FK506 为较强的免疫抑制剂。不能耐受或用环孢霉素或 FK506 失败的移植病人有时成功地改用其它药物。

另一实施例，炎性肠疾病（ IBO)是具有不同临床表征的两种疾病，Crohn's 病和溃疡性结肠炎（ UC ）的通称。环孢霉素已被成功地用于治疗 Crohn's 病，已经在至少疾病活性的一个指标上证明具有治疗的统计学显著结果[Brynskov,Dan. Med. Bull. 41: 332-344 （ 1994 ）]。然而，其它与急性加重的缓解有最好的相关性的指标没有显示出针对改善的显著趋势。环孢霉素还对严重急性类固醇－抗性 UC 显示活性（因为试验由于伦理原因而停止，所以数据不重要）。其它患有硬化性胆管炎和 UC 的病人的试验证明对 UC 较轻过程的边界上的显著性。撤药后的复发是普遍的，而且治疗由于毒性而受限制[Choi and Targan, Dig. Dis. and Sci. 39: 1885-1892(1994)]。此外，其它免疫抑制剂已成功用于 IBD，如氨甲喋呤，硫唑嘌呤和 6-MP 。

另一个实施例，环孢霉素当用作二线或三线的疾病疗法时，在一些试验中证明对治疗类风湿关节炎有效，即对治疗那些对其它疗法失败并具有严重疾病的病人。在这些实验中，环孢霉素被发现总的与其它二线药物，如金，抗疟药，硫唑嘌呤， D －青霉胺和氨甲喋呤一样有效和有毒[Wells and tugmell, Br. J. Rheum., 32(suppl 1): 51-56 (1993); Forre et al.,

Arth. Rheum., 30: 88-92(1987)]。试验仅报道“非常严重的顽固性RA”的治疗，因为环孢霉素的“潜在的不可逆毒性”[dougados and Torley, Br. J. Rheum., 32(suppl 1): 57-59 (1993); 肾毒性被认为主要通过加重NSAID肾中毒的肾血管收缩以及类风湿关节炎固有的肾病所介导[Leaker and Cairns, Br. J. Hosp. Med., 52: 520-534 (1994); Sturrodk et al., Nephrol. Dial. Transplant, 9: 1149-1156(1994); Ludwin and Alexopolulou, Br. J. Rheum., 32 (suppl 1): 60-64(1993)]。用环孢霉素治疗的RA病人的大约10％肾活检显示环孢霉素毒性的形态学特征 [International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporin in Autoimmune Disease, Br. J. Rheum., 32(suppl1):65-71(1993)]。

另一个实施例，已报道环孢霉素对治疗类固醇依赖的哮喘病有效。在一个试验中，少量病人被随机分组服用环孢霉素或安慰剂，环孢霉素组展现气流和FVC增加，以及较少的氢化泼尼松获救病程。

另一个实施例，环孢霉素对治疗依赖于类固醇的基本变化疾病肾病综合症有效。该试验的病人显示在低剂量环孢霉素下具有较低的类固醇需求，但环孢霉素中断时全都复发。肾病综合症的抗类固醇形式对环孢霉素仅有20－30％的反应率，[Meyrier, Nephrol. Dial. Transplant, 9: 596-598(1994); Hulton et al., Pediatr. Nephrol., 8: 401-403(1994)]。

关于治疗全身性红斑狼疮（SLE），一项研究报道在预期的非随机、非对照研究中SLE活性指标的显著下降[Tokrda et al., Arthr. Rheumat., 37: 551-558 (1994)]。然而其它研究未证明对SLE的效能。

作为另一个实施例，环孢霉素当糖尿病最初呈现后早期用药，显示诱导胰岛素依赖的糖尿病的缓冲。虽然某些延长至850天，缓解平均约1年[Jenner et al., Diabetologia, 35: 884-888 (1992); Bougneres et al., Diabetes, 39:1264-1272(1990)]。在一项研究的后续阶段没有注意到环孢霉素的比期持续作用[Martin et al., Diabetologia, 34:429-434(1991)]，然而在另一项研究中，在治疗12－18个月期间肾功能衰退，并未完全回到安慰剂水平，表明可能发生一些慢性肾损伤[Feldt-Rasmrssen et al., Diabetes Medicine, 7: 429-433 (1990)]。对胰岛素依赖糖尿病的免疫抑制治疗可能需要早期干预以增强疗效。一些研究人员正在普查直系亲属并成功地预防性地治疗那些具有糖尿病指标的[Elliott and Chase, Diabetologia, 34: 362-365 (1991)]。

另一个实施例，环孢霉素已有效地治疗牛皮癣[Cuellar et al., Balliere's Clin. Rheum., 8: 483-498 (1994); Ellis et al., JAMA 256: 3110-3116 (1986)]。对于治疗牛皮癣关节炎，破坏性关节炎的一种特殊经历形式，高剂量疗法是有效的，并且治疗中断通常紧接着皮肤和关节疾病的加重。鉴于可能的副作用以及连续长期治疗的需要，环孢霉素仅对顽固性牛皮癣关节炎需要，该病通过其它方法不能充分治疗。

此外，在安慰剂对照及双盲试剂中已证明环孢霉素对治疗严重的特应性皮炎有效[Van Joost et al., Br. J. Derm., 130:634-640 (1994); Cooper, J. Invest. Derm., 102:128-137(1994)]。药物的恶心、腹部不适、感觉异常、胆汁郁积及肾功能不全副作用宁可被病人们接受，也不愿忍受他们的未治之症。另一个随机双盲、安慰剂对照实验发现环孢霉素治疗明显增加了具有严重特应性皮炎病人的生活质量[Salek et al., Br. J. Derm., 129:422-430(1993)]。停止环孢霉素后皮肤损害马上复发，但生活质量仍保持改善。

另一个实施例，环孢霉素被用于治疗手的慢性皮炎，一种被报道 4 - 22 % 流行的疾病，典型地用局部类固醇治疗，而许多病人没有反应。在一个开放试验中，低剂量环孢霉素已显示对 6/7 病人有效地治疗[Reitamo and Granlrnd, Br. J. Derm. 130: 75-78(1994)]。环孢霉素中断后大约一半病人复发。

另一个实施例，环孢霉素用于治疗荨麻疹和血管水肿，表现为荨麻疹和皮下水肿的先天性皮肤病。其病理学涉及肥大细胞，治疗常常无效。在一个实验中，具有顽固性荨麻疹和血管水肿的三位病人用环孢霉素治疗，在一周内所有症状消除[Fradin et al., J. Am. Acad. Derm., 25: 1065-1067(1991)]。由于副作用所有病人不得不停止治疗，治疗中断后症状又出现。

关于其它类风湿关节炎疾病，研究报道环孢霉素对其它不常见自身免疫疾病的有效治疗，包括贝切特氏病[Pacor et al., Clin. Rheum., 13: 224-227(1994)]，韦格氏肉芽肿病[Allen et al., Cyclosporin A Therapy for Wegner's Grannlomatosis in ANCA-Assoiated Vascnlidites: Immunological and Clinical Aspects, Gross ed. Plennm Press(1993)]，和免疫介导的血小板减少症[Schultz et al., Blood 85:1406-1408(1995)]。

在上述许多试验中，环孢霉素或 FK506 的使用与许多不期望的副作

用相关。总的来说，感染和恶变危险的增加与普通性的免疫抑制有关，锚着蛋白相关的免疫抑制可能具有相似的危险。然而，通过锚着蛋白组织特异性可避免或减少其它副作用。环孢霉素和FK506的最常见的严重副作用是肾毒性，它至少在某种程度上是剂量相关的并在多数病人中出现，通常以治疗期间血管小球滤过率减少的形式。但这个副作用至少当中止给药时可部分逆转[leaker and Cairns, 见上]。典型地，进行性肾机能不全不发展，虽然对最后的评价需要更多的对病人定期复查。在接受低剂量环孢霉素（3－4mg/kg/d）的病人中也观察到慢性损害，这些病人约40％活检显示间质纤维变性，管萎缩和小动脉病[Svarstad et al., Nephrol. Dial. Transplant, 9:1462-1467 (1994); Young et al., Kidney International , 46:1216-1222(1994)]。组织切片中内皮细胞之变化也是明显的[Kahan , N. Engl. J. Med., 321: 1725-1748(1989)]。虽然药物对管细胞和血管间质细胞也显示直接毒性[Platz et al., Transplantation, 58:170-178(1994)], 但肾毒性被假定主要由小动脉血管收缩和慢性低度缺血所致[leaker and Cairns, 见上]。一些报道表明, FK506的发生率及肾毒性严重性稍高[Platz et al.,见上]。

另一报道的环孢霉素与FK506的重要毒性是神经毒性，具有临床表现包括疾病突然发作，紊乱、失明、昏迷、头痛、运动失调，帕金森氏综合症、感觉异常，精神病，病灶性缺陷，运动不能哑症，震颤，神经病和睡眠紊乱 [Shimizu et al., Pediatr. Nephrol., 8:483-385 (1994); Wilson et al., Muscle and Nerve, 17:528-532 (1994); Reece et al., Bone Marrow Transpl., 8: 393-401(1991); Eidelman et al., Transpl., Proc., 23: 3175-3178 (1991); de Groen et al., N Engl. J. Med., 317:861-566 (1987)]。肝移植后，严重神经毒的减轻显示在用 FK506 及环孢霉素治疗的病人比例分别为10－20％和3－12％神经毒性也与血清脂紊乱和肝机能障碍有关。

环孢霉素和/或FK506的其它副作用包括肝毒性葡萄糖不耐症，高血压，多毛症，胃肠症状，静脉血栓症，前列腺炎和齿龈增生[Morris, J. Heart Lung Transplant, 12:S275-S286 (1993); Fung et al., Transpl., Proc., 23: 3105-3108 (1991); Mason, Pharmacol. Rev., 42:423-434(1989); Kahan, N. Engl. J. Med., 321:1725-1738 (1989); Thomason et al., Renal Failure, 16: 731-745 (1994)]。因此，鉴于环孢霉素及FK506的广泛应用和其使用的固有副作用，开发其它免疫抑制剂特别有益。

例如，在 T 细胞活化中，钙调磷酸酶从推断的 T 细胞锚着蛋白移位可能抑制神经钙蛋白活性，因此提供一种具有环孢霉素或 FK506 用途但较少副作用的 T 细胞特异性免疫抑制剂。前面观察到 PKA 从 T 细胞锚着蛋白移位在被刺激细胞中增强 IL-2 表达，表明锚着蛋白定位的 PKA 在 T 细胞活化过程中，以某种方式对 IL-2 表达起调节作用。因此 PKA 的 T 细胞特异性定位可能提供一种体内增加 IL-2 分泌的手段，模仿重组 IL-2 给药并可能减少先前报道的如下所述 IL-2 治疗的毒性。

IL-2 已被同意用于治疗转移性肾癌，大约 15 - 20 % 的患转移性肾细胞癌或恶性黑色素瘤的病人对 IL-2 治疗有反应。某些反应是可持续的，持续多于 66 个月[Dillmen, Cancer Biotherapy, 9:183-209 (1994); Whittingto and Faulds, Drugs 46:446-514 (1993)]。虽然高剂量大丸剂疗法与一些严重副作用（如下所述）相关，但低剂量皮下或连续输注疗法在减少毒性时产生适中的反应率（ 12 % ）[Vogelzang et al., J. Clin. Oncol., 11:1809-1816 (1993)]。

IL-2 疗法（与或不与干扰素 - α 及其它药剂）已被研究用于治疗其它恶性肿瘤。例如，胶质瘤切除后直接在肿瘤病灶处用 IL-2，已得到持续的临床反应，但无治愈[Merchant et al., J. Neuro. 8:173-188(1990)]。在其它试验中，对淋巴瘤[Dillman, 见上]，结肠癌[Whittington and Faulds, 见上]，限制性 AML[Bruton and Koeller, Pharmacotherapy, 14:635-656(1994)], 卵巢癌和早期膀胱癌[Whittington and Faulds, 见上]已报道有有限的效能。这些实验中每一个的参加者的数目都太小，不能针对效能得出重要结论。

IL-2 还与采用的免疫疗法联合使用，并证明对治疗转移性肾癌有效[Pierce et al., Sem. Oncol, 22:74-80(1995); Belldegrun et al., J. Uro., 150:1384-1390(1993)]。此外，IL-2 还对治疗某些感染性疾病有效，通过皮内注射后减少麻风病人皮肤细菌负载与抗原水平[Kaplan, J. Infeet. Dis. 167(Sappl1):S 18-22(1993)]。还观察到与 PPD - 阳性健康对照相比，结核病人的淋巴细胞产生低水平的 IL-2[Sanchez et al., Inf. Immun., 62:5673-5678(1994)]，提示 IL-2 疗法可能对治疗分枝杆菌感染有价值。

不管 IL-2 可能的治疗价值，该细胞因子也有明显毒性[除非另外注明，来源自 Whittington and Faulds, Dillman and Bruton and Koeller, 见上]。主要的限制治疗副作用是毛细血管渗漏综合症。IL-2 给药增加引起

间质和肺水肿的血管渗透性，使病人形成低血压及大量需要增压物质。强有力的液体复苏会导致有生命危险的肺水肿。高达 20 % 的病人可能需要插管和机械通风。高剂量大丸剂给药比低剂量或连续地缓慢灌注引起更严重的渗漏，在一些编组中， 100 % 病人在 IL-2 治疗期间需要 ICU 。也已观察到心肌炎，心肌病和心律失常。作为毛细血管渗漏综合症－诱导的低血压的结果，可能发生急性肾衰竭。

IL-2 还能引起腹泻及电解质失衡，胆汁郁积、甲状腺异常和急性前列腺炎。在 15 － 20 % 受治病人中出现需输血的贫血[Mac Farlane et al., Cancer 75:1030-1037(1995)]。可发生出血性血小板减少，并且常常凝血通路缺陷。大约 70 % 病人精神状况感受变化，包括妄想狂样妄想，错觉，无兴趣，睡眠紊乱，和呆滞。昏迷，视觉缺陷，短暂缺血发作及感觉异常也有报道。这些与外源性 IL-2 相关的缺点提示应开发作为可能治疗的替代品，其中如可调节内源性 IL-2 产生，因而消除需要外源性 IL-2 治疗。

除了提供鉴定免疫抑制药物的可能方法和 IL-2 产生的调节子，鉴于锚着蛋白自己显示参加不同的代谢途径，锚着蛋白的鉴定使调节其它细胞活性成为可能。例如，大概通过结合 PKA ， PKC 和神经钙蛋白，AKAP79 在调节神经元突触后密度的谷氨酸受体调节的离子通道中是重要的。 PKA 调节 AMPA 受体－调节的通道的活性，而且 PKA 的移位或抑制减弱 AMPA 离子通道活性。 PKC 调节 NMDA 受体调节的通道的活性，神经钙蛋白显示使 NMDA 受体对外来刺激不敏感。这些观察表明定位的激酶（ PKA 和 PKC ）可能在神经元中调节谷氨酸受体的活性。神经钙蛋白的去磷酸化作用是 NMDA 受体的对抗调节机制。此模型生理上与环孢霉素或 FK506 诱导的发作的事实一致。

此外，谷氨酸受体已在许多神经疾病中有牵连。谷氨酸及其它兴奋性氨基酸可对神经元产生兴奋毒性，并且突触后谷氨酸受体的过度刺激已显示对神经元有毒，导致急性神经元变性。缺氧症（如中风或心肌梗塞后）和 CNS 外伤已表明引起显著的谷氨酸外排入细胞外空间，然后与谷氨酸受体相互作用开触发兴奋毒性的级联放大。抗兴奋性药物已显示在动物模型中保护大脑损伤[Olney, Neurobiolegy of Aging; 15:259-260(1994)]。有趣的是， NMDA 拮抗剂对一些类型神经元有毒，表明谷氨酸在那些细胞中可能抑制其它的兴奋通路。大环内酯抗体，如 FK506 也显示抗 NMDA 的保护作用，但不对培养神经元抗钾盐镁矾兴奋毒性起

保护作用[Manev, et al., Brain Res., 624:331-335 (1993)]。

谷氨酸还与帕金森氏病有关。在接受 MPTP 的猴子中， NMDA 拮抗剂保护物质黑质中的多巴胺能神经元， MPTP 是一种在人及其它灵长目动物中诱导帕金森氏综合症的化学药品。金钢烷胺和 memantine 为 NMDA 拮抗剂，已在欧洲用于治疗帕金森氏病，但两者都显示在某些病人中引起精神病。还有一些证据，谷氨酸能神经元可能在帕金森氏病中极度活跃，抑制作用可能减少该病的运动症状[Lange and Riederer, Life Sciences, 55:2067-2075(1994)]。

谷氨酸还在发作失调中起作用，参与发作活性的开始，传播及维持。NMDA 和非 NMDA 拮抗剂是有效的抗痉剂[Meldrum, Neurology, 44(suppl 8):S 14-S 23(1994)]。 AMPA 受体已与 ALS 有关系，现在正在进行受体拮抗剂的临床试验。[49]

就所有这些观察而言，不奇怪其它许多免疫抑制剂正处于临床试验中。关于这些实验的下列信息来自 Haydon and Haynes, Balliere's Clin. Gastroentero., 8:455-464 (1994); Thomason and Starzi, Immunol. Rev. 1993, 71-98 (1993); and Morris J. Heart Lung Transplant., 12:S275-S286 (1993)。例如，重氮螺烷是一种 SKB 化合物，它抑制移植物细胞渗液并诱导 IL-2R， 而且废除 IL-2 和 IFN －γ产生。显然重氮螺烷诱导某些类型的抑制细胞，并与环孢霉素有协同作用的一些证据。

另一个实施例， mycophenolate mofetial 是一种 Syntex 化合物，它抑制嘌呤合成，并具有 T 和 B 细胞选择性抗增殖作用。它减少抗体。Mycophenolate mofetial 还可以耗尽细胞表面的粘附分子。虽然该药物明显低毒，但它可引起白血球减少，被用来治疗牛皮癣已 20 年。

另一个实施例， Sumitome 化合物中的 mizoribine，它抑制 ONA 合成。其作用机制与霉酚酯相同。

另一个实施例， brequinar 是一种杜邦－默克化合物，它通过阻断二氢乳清酸脱氢酶抑制嘧啶合成。期待临床试验的全部报告。该药物已报道与环孢霉素协同作用，但可引起血小板减少，皮炎和粘膜炎。

另一个实施例， 15 －脱氧斯泼耐林是一种 Nippon-Kayaku 化合物，它主要影响单核细胞/巨噬细胞作用，包括抑制氧化代谢，溶酶体的酶合成， IL － 1 产生和 II 类 MAC 抗原的细胞表面表达。它对顽固性肾排斥 70 － 90 % 有效，但在较高剂量可能出现骨髓毒性。

另一个实施例， leflumemide 是一种 Hoechst 化合物，它抑制细胞因子作用，阻断 T 细胞活化及抗体合成。它对肾或骨髓无毒。

另一个实施例，雷帕霉素是与 FK506 有关的 Wyeth-Ayerst 化合物。它是一种前药，必须结合亲免素才有活性，并不抑制钙调磷酸酶和阻断 T 细胞细胞因子产生。雷帕霉素通过未知的机制阻断 G1 到 S 过渡。

对本发明如上所述解释的实施例中许多修改和变动对本领域技术人员是期望出现的。因而只有在附属的权利要求中出现的限制应放入本发明。

序列表

(1) 总说明

(I) 申请人 Lockerbi, Robert O.

(ii) Kashishian, Adam

(iii) 发明题目: 新的 PKA - 结合蛋白及其用途

(iv) 序列数目: 5

(v) 通讯地址:

(A) 地址: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borum

(B) 街道: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower

(C) 城市: 芝加哥

(D) 州: 伊利诺斯

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 60606 - 6402

(vi) 计算机可读方式:

(A) 介质类型: 磁带

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS

(D) 软件: PatentIn Release # 1.0, # 1.25 版

(vi) 目前申请数据:

(A) 申请号:

(B) 提交日期:

(C) 分类:

(viii) 律师/代理人资料:

(A) 姓名: Williams Jr., Joseph A.

(B) 注册号: 38,659

(C) 委托/摘要号: 27866

(ix) 电信资料:

(A) 电话: 312-474-6300

(B) 传真: 312-474-0448

(C) 用户电报: 25-3856

(2) SEQ ID NO:1 的说明:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO:1

```
Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu
1               5                  10                  15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala
            20
```

(2) SEQ ID NO:2 的说明:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2

```
Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Pro Val Asp Ala Val Ile Glu
1               5                  10                  15

Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala
            20
```

(2) SEQ ID NO:3 的说明:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3

```
ATTAACCCTC ACTAAAG
```

17

(2) SEQ ID NO:4 的说明:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4

GATATCACTC AGCATAA 17

(2) SEQ ID NO:5 的说明:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2850 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5

GGCACGAGGA GCAGCAGGTG GAGGCTGGTG CTGTGCAGCT GAGGGCTGAC CCTGCCATCA 60

AGGAACCTCT CCCCGTGGAA GACGTCTGTC CCAAAGTAGT GTCCACACCC CCCAGTGTCA 120

CAGAGCCTCC AGAAAAGGAA CTGTCCACCG TGAGCAAGCT GCCTGCAGAG CCCCCAGCAT 180

TGCTCCAGAC ACACCCACCT TGCCGAAGAT CAGAGTCCTC GGGCATTCTT CCTAACACCA 240

CAGACATGAG ATTGCGACCA GGAACACGCA GAGACGACAG TACAAAGCTG GAGCTAGCCC 300

TGACAGGTGG TGAAGCCAAA TCGATTCCTC TAGAGTGCCC CCTTTCATCC CCAAAGGGTG 360

TACTATTCTC CAGCAAATCA GCTGAGGTGT GTAAGCAAGA TTCCCCCTTC AGCAGGGTGC 420

CAAGGAAGGT CCAGCCAGGC TACCCCGTAG TCCCCGCAGA GAAGCGTAGC TCTGGGGAGA 480

GGGCAAGAGA GACAGGTGGG GCCGAAGGGA CTGGTGATGC CGTGTTGGGG GAAAAGGTGC 540

TTGAAGAAGC TCTGTTGTCT CGGGAGCATG TCTTGGAATT GGAGAACAGC AAGGGCCCCA 600

GCCTGGCCTC TTTAGAGGGG GAAGAAGATA AGGGGAAGAG CAGCTCATCC CAGGTTGGTG 660

GGGCCAGTGC AGGAGGAAGA GTATGTAGCA GAGAAGTTGC CAAGTAGGTT CATCGAGTCG 720

GCTCACACAG AGCTGGCAAA GGACGATGCG GCGCCAGCAC CCCCAGTCGC AGACGCCAAA 780

GCCCAGGACA GAGGTGTCGA GGGAGAACTG GGCAATGAGG AGAGCTTGGA TAGAAATGAG 840

GAGGGCTTGG ATAGAAATGA GGAGGGCTTG GATAGAAATG AGGAGAGCTT GGATAGAAAT 900

GAGGAGGGCT TGGATAGAAA TGAGGAGATT AAGCGGGCTG CCTTCCAGAT AATCTCCCAA 960

GTGATCTCAG AAGCAACCGA ACAGGTGCTG GCCACCACGG TTGGCAAGGT TGCAGGTCGT 1020

GTGTGTCAGG CCAGTCAGCT CCAAGGGCAG AAGGAAGAGA GCTGTGTCCC AGTTCACCAG 1080

AAAACTGTCT TGGGCCCAGA CACTGCGGAG CCTGCCACAG CAGAGGCAGC TGTTGCCCCG 1140

CCGGATGCTG GCCTCCCCTT GCCAGGCCTA CCAGCAGAGG GCTCACCACC ACCAAAGACC 1200

TACGTGAGCT GCCTGAAGAG CCTTCTGTCC AGCCCCACCA AGGACAGTAA GCCAAATATC 1260

TCTGCACACC ACATCTCCCT GGCCTCCTGC CTGGCACTGA CCACCCCCAG TGAAGAGTTG 1320

CCGGACCGGG CAGGCATCCT GGTGGAAGAT GCCACCTGTG TCACCTGCAT GTCAGACAGC 1380

AGCCAAAGTG TCCCTTTGGT GGCTTCTCCA GGACACTGCT CAGATTCTTT CAGCACTTCA 1440

GGGCTTGAAG ACTCTTGCAC AGAGACCAGC TCGAGCCCCA GGGACAAGGC CATCACCCCG 1500

CCACTGCCAG AAAGTACTGT GCCCTTCAGC AATGGGGTGC TGAAGGGGGA GTTGTCAGAC 1560

TTGGGGGCTG AGGATGGATG GACCATGGAT GCGGAAGCAG ATCATTCAGG AGGTTCTGAC 1620

AGGAACAGCA TGGATTCCGT GGATAGCTGT TGCAGTCTCA AGAAGACTGA GAGCTTCCAA 1680

AATGCCCAGG CAGGCTCCAA CCCTAAGAAG GTCGACCTCA TCATCTGGGA GATCGAGGTG 1740

CCAAAGCACT TAGTCGGTCG GCTAATTGGC AAGCAGGGGC GCTATGTGAG TTTTCTGAAG 1800

CAAACATCTG GTGCCAAGAT CTACATTTCA ACCCTGCCTT ACACCCAGAG CGTCCAGATC 1860

TGCCACATAG AAGGCTCTCA ACATCATGTA GACAAAGCGC TGAACTTGAT TGGGAAGAAG 1920

TTCAAAGAGC TGAACCTCAC CAATATCTAC GCTCCCCCAT TGCCTTCACT GGCACTGCCT 1980

TCTCTGCCGA TGACATCCTG GCTCATGCTG CCTGATGGCA TCACCGTGGA GGTCATTGTG 2040

GTCAACCAGG TCAATGCCGG GCACCTGTTC GTGCAGCAGC ACACACACCC TACCTTCCAC 2100

GCGCTGCGCA GCCTCGACCA GCAGATGTAC CTCTGTTACT CTCAGCCTGG AATCCCCACC 2160

TTGCCCACCC CAGTGGAAAT AACGGTCATC TGTGCCGCCC CTGGTGCGGA CGGGGCCTGG 2220

TGGCGAGCCC AAGTGGTTGC CTCCTACGAG GAGACCAACG AAGTGGAGAT TCGATACGTG 2280

GACTACGGCG GATATAAGAG GGTGAAAGTA GACGTGCTCC GGCAAATCAG GTCTGACTTT 2340

GTCACCCTGC CGTTTCAGGG AGCAGAAGTC CTTCTGGACA GTGTGATGCC CCTGTCAGAC 2400

GATGACCAGT TTTCACCGGA AGCAGATGCC GCCATGAGCG AGATGACGGG GAATACAGCA 2460

CTGCTTGCTC AGGTGACAAG TTACAGTCCA ACTGGTCTTC CTCTGATTCA GCTGTGGAGT 2520

GTGGTTGGAG ATGAAGTGGT GTTGATAAAC CGGTCCCTGG TGGAGCGAGG CCTTGCCCAG 2580

TGGGTAGACA GCTACTACAC AAGCCTTTGA CCCCCATGCT GCTTCCTGAG AGTCTTTTTT 2640

GCACTGTTGA AATTGGGCTT GGCACTCAAG TCAAAGATGA ACATCGGAAT AACAAACATT 2700

GTCCTCTCCA GAAAGTCCTT TCTTTATCCA TACTGTAGTC CTATTGAGAA GACATTTCGT 2760

CTCTGAGAAA AAAGGATGGA ACTATGGGTT CTCTTCGCAA AGCCAAAGGA TAGTGTTTAA 2820

CAAGCCAGCT GGCTTATCCT GGCTCGTGCC 2850