

[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 99805362.7

C07K 14/47

C12N 15/12

C12Q 1/68

C12N 5/10

C07K 16/18

G01N 33/53

A61K 38/17

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1223608C

[22] 申请日 1999. 12. 23 [21] 申请号 99805362.7

[30] 优先权

[32] 1998. 12. 24 [33] IL [31] 127721

[32] 1999. 9. 28 [33] IL [31] 132105

[86] 国际申请 PCT/IL1999/000698 1999. 12. 23

[87] 国际公布 WO2000/039160 英 2000. 7. 6

[85] 进入国家阶段日期 2000. 10. 23

[71] 专利权人 依达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

[72] 发明人 D·沃勒克 M·舒赫曼

T·冈察洛夫

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 70 页 附图 19 页

[54] 发明名称 与半胱天冬蛋白酶 - 8 相互作用的蛋白

[57] 摘要

提供了与半胱天冬蛋白酶 - 8 相互作用的蛋白质。 还提供了这些蛋白质的生产和用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种能与半胱天冬蛋白酶-8 的亚基 1 和/或亚基 2 相互作用的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，它是具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的人 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的蛋白，它在体外被半胱天冬蛋白酶-8 切割。
3. 根据权利要求 1 所述的蛋白，它在体内被半胱天冬蛋白酶-8 切割。
4. 一种分离的 DNA 序列，它编码权利要求 1 所述的蛋白。
5. 一种分离的 DNA 序列，它含有 SEQ ID NO:3 所示的 DNA 序列。
6. 一种载体，它含有权利要求 4 或 5 所述的 DNA 序列。
- 10 7. 一种真核或原核宿主细胞，它含有权利要求 6 所述的载体。
8. 一种产生权利要求 1 所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的方法，该方法包括使权利要求 7 所述的宿主细胞在允许所述蛋白产生的条件下生长，按照需要影响翻译后的修饰，获得所述蛋白，然后分离所述蛋白。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中细胞是原核细胞。
- 15 10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中细胞是真核细胞。
11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中细胞是哺乳动物、昆虫或酵母细胞。
12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中细胞是 HeLa 细胞或 293 T HEK 细胞。
13. 根据权利要求 8 所述的方法，其中用人 CMV 启动子作为启动子。
14. 一种抗体，它针对权利要求 1 所述的蛋白的表位。
- 20 15. 根据权利要求 14 所述的抗体，其中所述抗体是单克隆抗体。
16. 一种用于检测半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的免疫试验，该试验含有权利要求 15 所述的单克隆抗体作为试剂。
17. 一种用于检测半胱天冬蛋白酶-8 的免疫试验，该试验含有权利要求 1 至 3 任一项所述的蛋白。
- 25 18. 权利要求 1 所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，或权利要求 14 所述的抗体，在调节半胱天冬蛋白酶-8 活性中的应用。
19. 权利要求 1 所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，或权利要求 14 所述的抗体，在调节 TNF-受体或 Fas 介导的效应中的应用。
20. 权利要求 1 所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，或权利要求 14 所述的
- 30 抗体，在调节凋亡中的应用。
21. 权利要求 1 所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，或权利要求 14 所述的抗体，在制备药剂的应用。

与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白

5

发明领域

本发明总地涉及半胱氨酸蛋白酶领域。更具体地说，本发明涉及与半胱天冬蛋白酶-8(MACH)相互作用和/或调节其在 CD95(Fas/Apo-1)或 CD120a(p55-TNF 受体)介导的细胞死亡(或凋亡)通道中的功能的蛋白。

10 具体地说，本发明涉及与半胱天冬蛋白酶-8/MACH 直接或间接相互作用的蛋白。本发明还涉及与半胱天冬蛋白酶-8/MACH 相互作用的蛋白的制备和应用。

发明背景

15 肿瘤坏死因子(TNF- α)和淋巴毒素(TNF- β)(在下文中 TNF 指 TNF- α 和 TNF- β)是多功能促炎细胞因子，它们主要由单核吞噬细胞形成，对细胞有多种作用(Wallach, D. (1986), Interferon 7(Ion Gresser 编辑), 83-122 页, Academic Press, London; 和 Beutler 和 Cerami(1987))。TNF- α 和 TNF- β 通过结合特异性细胞表面受体来启动其作用。其中一些作用可能对生物体有利：它们可能会破坏(例如)肿瘤细胞或感染了病毒的细胞，并增强粒细胞的抗菌活性。通过这种方式，TNF 对于保护生物体抵御肿瘤和感
20 染性因子以及从损伤中恢复有贡献。因此，TNF 可用作抗肿瘤剂，在该应用中，它结合肿瘤细胞表面上的受体，从而启动了导致肿瘤细胞死亡的行为。TNF 还可用作抗感染剂。

然而，TNF- α 和 TNF- β 均有有害的作用。有证据表明，过度产生 TNF- α 会在几种疾病中起主要致病作用。例如，已经知道，TNF- α 主要作用于脉管结构，这是脓
25 毒休克症状的主要病因(Tracey 等, 1986)。在一些疾病中，TNF 可能会通过抑制脂肪细胞的活性和引起缺乏食欲而导致体重过度减轻(恶液质)，因此 TNF- α 称为恶液质素。另外，它还被描述成是风湿性疾病中组织损伤的一种中介体(mediator)(Beutler 和 Cerami, 1987)，以及移植物抗宿主反应中所见破坏的主要中介体(Piquet 等, 1987)。此外，已知 TNF 参与发炎过程和其它许多疾病。

30 两种不同的、独立表达的受体 p55(CD120a)和 p75(CD120b)TNF-Rs(它们与 TNF- α 和 TNF- β 特异性结合)启动和/或介导了 TNF 的上述生物学效应。这两种受体在结构上有不相似的胞内结构域，这暗示它们的信号传导方式不同(参见 Hohmann 等, 1989; Engelmann 等 1990; Brockhaus 等, 1990; Leotscher 等, 1990; Schall 等, 1990; Nophar 等,

1990; Smith 等, 1990;和 Heller 等, 1990)。然而, 例如涉及 CD120a 和 CD120b 胞内信号传导的各种蛋白和可能存在的其它因子的细胞机制还没有得到阐明。正是该胞内信号的传导(通常在配体(即 $\text{TNF}\alpha$ 或 β)结合受体后发生)致使级联反应开始并最终导致所见的细胞对 TNF 的反应。

- 5 关于上述 TNF 的杀细胞作用, 就目前研究的大多数细胞而言, 该作用主要由 CD120a 引发。抗 CD120a 胞外结构域(配体结合域)的抗体本身能引发杀细胞效应(见 EP 412486), 该效应与受体交联抗体的效率相关, 认为这是胞内信号传导过程产生的第一步。而且, 诱变研究(Brakebusch 等, 1992; Tartaglia 等, 1993)已经表明, CD120a 的生物功能取决于其胞内结构域的完整性, 因此, 已提出导致 TNF 杀细胞效应的胞内信号传导启动的发生是 CD120a 的两个或多个胞内结构域缔合的结果。而且, $\text{TNF}(\alpha$ 和 $\beta)$ 形成均三聚体, 因此, 已提出通过 CD120a 靠其结合和交联受体分子(即引起受体聚集)的能力来诱导胞内信号传导。

- TNF/NGF 受体超家族的另一个成员是 FAS/APO1 受体(CD95)(也称为 FAS 抗原), 它是在各种组织中表达的一种细胞表面蛋白, 它与许多细胞表面受体(包括
15 TNF-Rs 和 NGF-R)同源。CD95 以凋亡方式介导细胞死亡(Itoh 等, 1991), 并且好象是自身反应 T 细胞的阴性选择物, 即, 在 T 细胞成熟期间, CD95 介导了识别自身抗原的 T 细胞的凋亡性死亡。也已发现, CD95 基因(*lpr*)中的突变在小鼠中引起了与人自身免疫疾病—系统性红斑狼疮(SLE)—相似的淋巴细胞增生疾病(Watanabe-Fukunaga 等, 1992)。CD95 的配体看来是其它细胞中杀伤 T 细胞(或细胞毒性 T 淋巴
20 细胞-CTL)中携带的细胞表面相关分子, 因此, 当该 CTL 接触携带 CD95 的细胞时, 它们能诱导携带 CD95 的细胞编程性细胞死亡。另外, 已经制得对 CD95 有特异性的单克隆抗体, 该单克隆抗体能诱导携带 CD95 的细胞(包括被编码人 CD95 的 cDNA 转化的小鼠细胞)凋亡性细胞死亡(Itoh 等, 1991)。

- 尽管淋巴细胞的一些细胞毒性效应是通过淋巴细胞产生的配体与广泛存在的细胞表面受体 CD95(它能引发细胞死亡)的相互作用而介导的, 但是也已发现, 除 T 淋巴细胞外的其它各种正常细胞也在其表面表达 CD95, 并且能通过触发该受体而被杀死。怀疑是由于对该杀死过程的失控性诱导而导致了某些疾病中组织破坏(例如急性肝炎中的肝细胞破坏)。因此, 寻找方法来抑制 CD95 的细胞毒性活性可能会有治疗
25 潜力。

- 30 相反, 由于已经发现某些恶性细胞和 HIV 感染的细胞在其表面携带了 CD95, 因此可利用抗 CD95 的抗体或 CD95 配体来引发这些细胞中的 CD95 介导的胞毒作用, 从而提供一种抵抗这些恶性细胞或 HIV-感染的细胞的方法(见 Itoh 等, 1991)。因

此, 寻求其它方法来增强 CD95 胞毒活性可能也会有治疗潜力。

提供一种调节对 TNF(α 或 β)和 CD95 配体的细胞反应的方法是人们长期以来的需求。例如, 在上述病理场合下, 当 TNF 或 CD95 配体过度表达时, 就需要抑制 TNF 或 CD95 配体诱导的杀细胞效应, 而在其它场合, 例如伤口愈合的应用中, 则希望
5 增强 TNF 的效应, 或在 CD95 的情况下, 在肿瘤细胞或 HIV 感染的细胞中, 希望增强 CD95 介导的效应。

申请人已经用了各种方法(例如参见欧洲专利申请 No. EP 186833, EP 308378, EP398327 和 EP 412486)来调节 TNF 的有害作用, 方法是用抗 TNF 抗体或可溶性 TNF 受体(基本上是此受体的可溶性胞外结构域)与 TNF 竞争和细胞表面结合的 TNF-Rs
10 结合, 从而抑制 TNF 与其受体结合。另外, 由于 TNF 与其受体的结合是 TNF 诱导细胞效应所需的, 因此申请人已经设法通过调节 TNF-Rs 的活性来调节 TNF 的作用(例如参见 EP 568925)。

例如, EP 568925 涉及一种调节信号转导和/或 TNF-Rs 中断裂的方法, 从而肽或其它分子可与受体本身或与该受体相互作用的效应蛋白相互作用, 从而调节了
15 TNF-Rs 的正常功能。在 EP 568925 中, 描述了在 CD120a 的胞外、跨膜和胞内结构域中有突变的各种 CD120a 突变体的构建和性质分析。这样, CD120a 的上述结构域内的区域被确定为受体发挥功能(即与配体(TNF)结合以及随后的信号转导和胞内信号传导, 最终导致所见的 TNF 对细胞的效应)所必需的。而且, 该文还描述了许多分离和鉴定蛋白、肽或其它因子的方法, 这些蛋白、肽或其它因子能结合 CD120a 上
20 述结构域内的不同区域, 可能参与了 TNF-Rs 活性的调节或调控。在 EPO 368925 中还描述了分离和克隆编码这些蛋白和肽的 DNA 序列的方法; 构建表达载体来产生这些蛋白和肽的方法; 以及与 CD120a 或与结合 CD120a 不同区域的上述蛋白和肽相互作用的抗体或其片段的制备方法。然而, EP 568925 没有指明结合 TNF-Rs(如 CD95)胞内结构域的实际蛋白和肽, 也没有描述用来分离和鉴定结合 TNF-Rs 胞内结构域的
25 这些蛋白和肽的酵母双杂交方法。同样, EP 568925 也没有公开能结合 CD95 胞内结构域的蛋白或多肽。

因此, 当希望抑制 TNF 或 CD95 配体的作用时, 需要减少细胞表面的 TNF-Rs 或 CD95 的数量或活性, 而当需要增强 TNF 或 CD95 配体的作用时, 希望增加 TNF-Rs 或 CD95 的数量或活性。出于这一目的, 已经对 CD120a 和 CD120b 的启动子进
30 行了测序和分析, 并且已经发现了许多对不同转录调节因子有特异性的一些关键序列基序, 因此可以在其启动子水平来控制这些 TNF-Rs 的表达, 即通过抑制启动子的转录来减少受体数量, 增强启动子转录来增加受体数量(EP 606869 和 WO

9531206)。

尽管已经知道肿瘤坏死因子(TNF)受体以及结构上相关的受体 CD95, 在受白细胞产生的配体刺激时, 在细胞内引发了导致细胞自身死亡的破坏性活性, 但是对该引发的机制仍知之甚少。突变研究表明, 在 CD95 和 CD120a 中, 细胞毒性的信号传导涉及其胞内结构域的不同区域(Brakebusch 等, 1992; Tartaglia 等, 1993; Itoh 和 Nagata, 1993)。这些区域(“死亡结构域”)的序列相似。CD95 和 CD120a 的“死亡域”均有自身缔合(self-associate)的趋势。它们的自身缔合明显促进了信号传导作用启动所需的受体聚集(见 Song 等, 1994; Wallach 等, 1994; Boldin 等, 1995), 且在高水平受体表达下会导致引发不依赖于配体的信号传导(Boldin 等, 1995)。

一些淋巴细胞的细胞毒性效应受淋巴细胞产生的配体和 CD95 相互作用所介导, CD95 是一种广泛存在的细胞表面受体, 它能引发细胞死亡(另见 Nagata 和 Golstein, 1995); 而单核吞噬细胞杀死细胞作用涉及配体-受体配对—TNF 及其受体 CD120a; 它们在结构上与 CD95 及其配体相关(另见 Vandenabeele 等, 1995)。和其它受体诱导的效应一样, TNF 受体和 CD95 通过一系列蛋白-蛋白相互作用(从配体-受体结合到最终激活酶促效应功能)诱导细胞死亡, 在研究中已经描述启动细胞死亡信号传导作用的非酶促蛋白-蛋白相互作用: TNF 或 CD95 配体三聚体分子与受体结合, 其胞内结构域相互作用(Brakebusch 等, 1992; Tartaglia 等, 1993; Itoh 和 Nagata, 1993)由于死亡域基序自身缔合的趋势而增强(Boldin 等, 1995a), 以及两种细胞质蛋白(这两种蛋白也能相互结合)与受体胞内结构域受诱导结合—MORT-1(或 FADD)与 CD95 结合(Boldin 等, 1995b; Chinnaiyan 等, 1995; Kischkel 等, 1995), TRADD 与 CD120a 结合(Hsu 等, 1995; Hsu 等, 1996)。用酵母双杂交筛选程序鉴定出三种蛋白, 这些蛋白与 CD95 和 CD120a 胞内结构域的“死亡结构域”结合, 而“死亡结构域”通过同源区域的异质性缔合来参与受体诱导细胞死亡, 这些蛋白还能独立地引发细胞死亡。它们中的一种蛋白是 MORT-1(Boldin 等, 1995b), 也称为 FADD(Chinnaiyan 等, 1995), 它能特异性地结合 CD95。第二种是 TRADD(另见 Hsu 等, 1995, 1996), 它与 CD120a 结合, 第三种是 RIP(另见 Stanger 等, 1995), 它与 CD95 和 CD120a 结合。这些蛋白除了能结合 CD95 和 CD120a 外, 还能相互结合, 从而在 CD95 和 CD120a 之间提供了功能性“串话(cross-talk)”。这些结合发生在受体及其缔合蛋白中共有的保守序列基序—“死亡结构域组件”中。另外, 尽管在酵母双杂交测试中, MORT-1 显示出自发结合 CD95, 但是在哺乳动物细胞中, 这一结合只有在受体受刺激后才会发生, 这暗示 MORT-1 参与了 CD95 信号传导的启动行为。MORT-1 不含酶活性特征的序列基序, 因此, 它引发细胞死亡的能力看来似乎并不是 MORT-1 本身固有的活性, 而

是激活了结合 MORT-1 的其它一些蛋白,并进一步作用于信号级联反应的下游。分子缺少 N 端部分的 MORT-1 突变体的细胞表达已经显示出阻断 CD95 或 CD120a 诱导的细胞毒性(Hsu 等, 1996; Chinnaiyan 等, 1996),这说明此 N 端区域通过蛋白-蛋白的相互作用传递了两种受体杀细胞效应的信号。

5 最近的研究已经暗示了一组胞质硫醇蛋白酶,它们在各种生理性细胞死亡过程开始时与 *Caenorhabditis elegans* 蛋白酶 CED3 以及哺乳动物白介素-1 β 转化酶(ICE)在结构上相关(综述见 Kumar,1995 和 Kenkart,1996)。也有一些迹象表明,该家族的蛋白酶可能参与了 CD95 和 TNF-Rs 诱导的细胞毒性。发现这些蛋白酶的特异性肽抑制剂以及封闭其功能的两种病毒编码的蛋白(牛痘蛋白 crmA 和杆状病毒 p35 蛋白)为细胞提供了抗此细胞毒性的保护力(Enari 等, 1995; Los 等, 1995; Tewari 等, 1995; Xue 等, 1995; Beidler 等, 1995)。某些特异性细胞蛋白的迅速断裂明显是由 CED3/ICE 家族蛋白酶介导的,这可在 CD95 或 TNF-Rs 刺激后不久在细胞内得到证实。

最近,已经分离、克隆并鉴定出这样一种蛋白酶及其各种同种型(包括抑制性的同种型),命名为 MACH(也称为半胱天冬蛋白酶(caspase)-8),它是一种 MORT-1 结合蛋白,作用是调节 MORT-1 活性进而调节 CD95 和 CD120a 的活性,可能还独立地作用于 MORT-1,关于其可能的用途在共同拥有的待批以色列专利申请 No. IL 114615, 114986, 115319, 116588 和 117932 及其对应的 PCT 申请 No. PCT/US96/10521 和本发明者最近的出版文献(Boldin 等, 1996)中有详细描述,它们全部纳入本文作参考。本发明者(未发表)和其它人(Fernandes-Alnemri 等, 1996; Srinivasula 等, 1996)最近还分离并鉴定出另一种此类蛋白酶及其各种同种型(包括抑制性同种型),其命名为 Mch4(也称为半胱天冬蛋白酶-10)。半胱天冬蛋白酶-10 也是一种 MORT-1 结合蛋白,其作用是调节 MORT-1 的活性,因此可能也能调节 CD95 和 CD120a 的活性,可能还独立作用于 MORT-1。因此,上述文献中还描述了关于半胱天冬蛋白酶-10 的所有方面、特征、性质和用途,所有这些文献均全部纳入本文作参考。

25 还应注意,半胱天冬蛋白酶、半胱天冬蛋白酶-8 和半胱天冬蛋白酶-10 具有相似的前域(prodomain)(见 Boldin 等, 1996; Muzio 等, 1996; Fernandes-Alnemri 等, 1996; Vincent 和 Dixit, 1997),它们通过其前域与 MORT-1 相互作用,该相互作用是通过 MORT-1 N 端部分中的、以及半胱天冬蛋白酶-8 和半胱天冬蛋白酶-10 中重复存在的“死亡域基序”或“死亡效应域”DED 而发生的(见 Boldin 等, 1995b; Chinnaiyan 等, 30 1995)。

这些蛋白酶(现在称为半胱天冬蛋白酶(半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶))是一个数量渐增的具有几个共同特征的半胱氨酸蛋白酶家族。已经发现大多数半胱天冬蛋

白酶参与了编程性细胞死亡或凋亡的启动和执行,而其他的看来参与了促炎细胞因子的产生(Nicholson DW 等人,1997, Salvesen GS 等人, 1997, Cohen GM 1997)。它们被合成作为无催化活性的前体,通常靠结构域间接头中存在的特异性内部天冬氨酸残基断裂来激活。半胱天冬蛋白酶的断裂位点用四肽序列(X-X-X-D)来确定,而断裂总发生在天冬氨酸的下游。结果,某些成熟的活性半胱天冬蛋白酶就能加工并激活其自身以及其他无活性的前体(Fernandes-Alnemri T 等人,1996, Srinivasula SM 等人,1996)。

编程性细胞死亡过程的激活通常是特异性的,涉及上游的半胱天冬蛋白酶(称为“启动”半胱天冬蛋白酶)对下游的半胱天冬蛋白酶(称为“执行半胱天冬蛋白酶”)的连续加工。这两类半胱天冬蛋白酶的结构也反映了它们的功能特征。实际上,“启动型半胱天冬蛋白酶”与“执行型半胱天冬蛋白酶”相比具有更长的前域区域(Salvesen GS 等人,1997, Cohen GM 1997)。长的区域允许“启动物”或“顶端半胱天冬蛋白酶”能被 TNF 受体家族的死亡受体触发激活。在配体诱导死亡受体发生三聚后,启动半胱天冬蛋白酶通过其长的 N-端前域被募集,与特异性衔接分子相互作用,形成了诱导死亡的信号传导复合物(Cohen GM 1997, Kischkel FC 等人,1995)。例如,半胱天冬蛋白酶-8/MACH 以及可能的半胱天冬蛋白酶-10(它含有两个死亡效应域(DED)或 FADD 结构域)被衔接分子 FADD/MORT-1 募集到受体复合物处,而半胱天冬蛋白酶-2 通过 CRADD/RAIDD 以及 RIP 被募集(Nagata S 等人,1997, Mac Farlane 等人, 1997, Ahmad M 等人,1997, Duan H 等人, 1997)。由于激活的受体复合物的三聚特征,认为至少两个半胱天冬蛋白酶分子相互毗邻,从而使它们通过自身催化加工被激活(Yang 等人,1998, Muzio 等人,1998)。

半胱天冬蛋白酶被合成作为由三个主要亚基组成的酶原,这三个亚基是 N-端前域以及两个亚基,两个亚基有时被一个接头肽隔开。两个亚基称为“长的”亚基或亚基 1(含有活性酶促位点)和“短的”亚基或亚基 2。为了完全激活酶,应使前域和两个亚结构域断裂。两个断裂的亚基形成了一个异二聚体,长的区域从 N-端衍生获得,短的亚基是半胱天冬蛋白酶前体的 C-端区域衍生获得。根据半胱天冬蛋白酶-3 的推定的三维结构,看来长结构域的 C-端和短亚基结构域的 N-端必须被释放,且短亚基的 C-端必须与长亚基的 N-端紧密毗邻,以便产生一个正确折叠的有活性的酶(Rotonda 等人,1996, Mittl 等人,1997, Srinivasula 等人, 1998)。

N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶是一种已知参与葡萄糖胺胞内代谢的胞内酶。已经从产生壳多糖酶的细菌霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中克隆了含有 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶的基因组 DNA 片段(Yamano 等人, Biosci Biotechnol Biochem. 61, p. 1349-53,

1997)。

编码大肠杆菌 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶的 nagA 基因也是已知的[例如参见 Peri 等人,1990 年 1 月 68(1), 123-137 页]。目前还未报道对人 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶作了克隆和测序。

5

发明概述

本发明提供了一种与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白(简称半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白), 或其同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物, 它能与半胱天冬蛋白酶-8 的亚基 1 和/或亚基 2 相互作用。

10

本发明还提供了人 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶, 或其同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物。

本发明还提供了包含图 2、3、5B 或 6 的氨基酸序列的蛋白质。

本发明还提供了包含 Tip-60 蛋白的氨基酸序列但不包括氨基酸 94 至 145 的蛋白质。

15

还包括在本发明范围内的蛋白质含有下文所述的克隆 P27、P70、P79、L7、L12、M26、B4、B17、J40、B13、B37、B33 或 P74 及其剪接变体 P16 和 P43 编码的氨基酸序列。

本发明还提供了如上所述的蛋白质, 它被半胱天冬蛋白酶-8 体外或体内切割。

20

本发明还提供了编码本发明蛋白质的分离的 DNA 序列。包含在该范围内的是图 2 和图 3 所示的 DNA 序列。另外还包括在本发明范围内的是能在中等严谨条件下与所述 DNA 序列杂交的分离的 DNA。

本发明还提供了—一个载体, 该载体包含如上所述的 DNA 序列。

本发明还提供了含有本发明载体的真核或原核宿主细胞。

25

本发明还提供了一种产生本发明与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白、其同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物的方法, 该方法包括使本发明的宿主细胞在允许所述蛋白质产生的条件下生长, 如所需的那样影响翻译后修饰, 获得所述蛋白、其同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物, 以及分离所述蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物。

30

本发明还提供所述方法, 其中细胞是原核细胞。

本发明还提供所述方法, 其中细胞是真核细胞。

本发明还提供所述方法, 其中细胞是哺乳动物、昆虫、或酵母细胞。

本发明还提供所述方法，其中细胞是 HeLa 或 293 T HEK 细胞。

本发明还提供所述方法，其中用人 CMV 启动子作为启动子。

另外，本发明还提供与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的肽，该肽含有本发明蛋白质的至少 4 个串联的氨基酸。

- 5 所述肽的衍生物也包括在本发明范围内。另外包括在本发明范围内的是能在接触所述半胱天冬蛋白酶-8 时与半胱天冬蛋白酶-8 形成共价键的所述肽的衍生物。

本发明还提供了对本发明 DNA 序列对应的核苷酸序列有特异性的核酶。

本发明还提供了一种反义寡核苷酸，它包含对应于本发明 DNA 序列的至少 9 个核苷酸序列。

- 10 本发明还提供了针对本发明蛋白质表位的抗体。

本发明还提供了一种用来检测与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白质的免疫试验，该试验包括本发明的抗体。

本发明还提供了一种用来检测半胱天冬蛋白酶-8 的免疫试验，该试验包括本发明的肽。

- 15 本发明还提供了一种用来检测半胱天冬蛋白酶-8 的免疫试验，该试验包括本发明的蛋白质。

本发明还提供了鉴定与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白质的方法，该方法包括下列步骤：

a)提供含有与启动子相连的含 DNA 序列基序的报道基因的酵母细胞；

- 20 a)在所述酵母细胞中表达所述半胱天冬蛋白酶-8 的 p20 亚基；

b)在所述酵母细胞内表达 DNA 结合域与所述半胱天冬蛋白酶-8 的 p10 和/或 p20 亚基的融合蛋白，其中所述 DNA 结合域能结合所述 DNA 序列基序；

c)任选地，在所述酵母细胞内表达出未融合的所述半胱天冬蛋白酶-8 的 p10 或 p20 亚基；

- 25 d)用由驱动融合蛋白表达的表达载体所组成的文库转化所述酵母细胞培养物，该融合蛋白由 cDNA 文库和转录激活子组成；

e)从转化的酵母细胞中筛选出报道基因激活的酵母细胞，和

f)分离步骤 e)的酵母细胞，并进一步分离出在其诱饵载体内表达的与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白质。

- 30 本发明还提供所述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体、或衍生物，所述核酶、反义寡核苷酸或抗体调节半胱天冬蛋白酶-8 活性的用途。

本发明还提供所述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体、或衍生物，所述核酶、反义寡核苷酸或抗体调节 TNF-受体或 Fas 介导的效应的用途。

5 本发明还提供所述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体、或衍生物，所述核酶、反义寡核苷酸或抗体调节凋亡的用途。

本发明还提供所述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体、或衍生物，所述核酶、反义寡核苷酸或抗体用作药剂的用途。

10 本发明还提供所述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体、或衍生物，所述核酶、反义寡核苷酸或抗体用作药剂来治疗有原发性少突神经胶质病(primary oligodendrogliopathy)的多发性硬化、自身免疫眼色素层视网膜炎(uveoretinitis)、糖尿病、狼疮、自身免疫心肌炎 I、HCV 介导的慢性肝炎、慢性胃炎如甲型胃炎、混合结缔组织疾病(MCTD)、Crohn 疾病或溃疡性
15 结肠炎的用途。

本发明还提供了能结合半胱天冬蛋白酶-8 相互作用基因启动子区域中富含嘌呤的序列的形成三联体的寡核苷酸。形成三联体的寡核苷酸可含有化学修饰，如用阳离子 N,N-二乙基-乙二胺、尿苷、苯并[g]-喹唑啉-2,4-二酮-(1H,3H)-二酮修饰核苷酸之间的磷酸键或用苯并[f]喹唑啉-2,4-二酮-(1H,3H)二酮残基代替胸苷残基。形成三联
20 体的寡核苷酸还可与对 DNA 有亲和力的化学物质共价连接，较佳的是可嵌入 DNA 的那些试剂，如吡啶和补骨脂素。

本文描述内容中的术语“相互作用”与本发明蛋白和半胱天冬蛋白酶-8 之间的相互作用有关，其意味着包括直接相互作用的形式，如结合、切割和间接的相互作用，如通过衔接蛋白。相互作用可能任选地导致调节半胱天冬蛋白酶-8 介导的信号。
25

本文描述内容中的术语“结合”，当指半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的结合时，是指半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白与半胱天冬蛋白酶-8 的物理结合。该物理结合可在半胱天冬蛋白酶-8 或其亚基和本发明蛋白的混合物进行免疫试验(如 ELISA 或 RIA 试验)、双杂交试验、免疫沉淀试验、体积分离为基础的试验(如非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或体积排阻凝胶层析)中测得。在采用双杂交试验时，认为半胱天冬蛋白酶-8 或其亚基被表达成 DNA 激活结构域融合物，半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白表达成 DNA 结合域融合物，或反过来。
30

术语“双杂交测试”指双杂交试验，其中通过在酵母细胞中导入编码第一蛋白与 DNA 结合域的融合物的第一表达载体以及编码第二蛋白与 DNA 激活结构域的融合物的第二表达载体，可以测定蛋白-蛋白的相互作用。酵母细胞必须含有至少一个被含有所述 DNA 结合域识别的 DNA 序列基序的启动子所推动的报道基因。通常，
5 采用两个报道基因，如组氨酸合成酶和 β -半乳糖苷酶。这使得研究者能避免由突变引起的假阳性。本申请人已经对该技术作了改进，用来筛选、分离和测试介导 TNF-Rs 和 Fas 信号的蛋白质，例如参见 WO 97/03998 及其中的参考文献。双杂交测试依靠两种融合蛋白定位于细胞核。

本文所用的术语“双杂交测试”还包括一种双杂交技术的改进方法，其中采用
10 了细胞生长信号传导蛋白，如 ras 和 sos(Broder 等人, Curr Biol 1998, 8, 1121-4 页, Aronheim 等人, Nucl. Acids Res. 1997 25, 3373-4 页及其参考文献)。为了起作用，这些蛋白质需要重新定位于细胞膜。这是通过将细胞生长信号传导蛋白和第一蛋白表达成融合物，将细胞膜定位信号(如十四烷基化信号序列)和第二蛋白表达成融合物来实现的。第一和第二蛋白之间的相互作用会使细胞生长信号传导蛋白重新定位于细
15 胞膜，从而触发细胞生长。然后选出攻击性生长的细胞作进一步研究。该系统与上述的双杂交系统不同，因为它不依靠两种杂交物定位于细胞核。

术语“诱饵”指上述双杂交测试中的蛋白质，它和 DNA 结合域表达成融合蛋白。

术语“捕获物”指上述双杂交测试中与 DNA 激活域一起表达成融合物的蛋白
20 质。

附图简述：

图 1 显示了用作实施例 1B 描述的双杂交筛选中的诱饵的半胱天冬蛋白酶-8 单链构建物的示意图。

25 图 2 是从 cDNA 克隆获得的编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的克隆 32 的初步部分核苷酸(SEQ ID NO: 1)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。

图 3 显示了由克隆 J2 的 5'延伸区、EST 克隆 AA460869 和外显子诱捕克隆 L48741 组成的 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶的推定人核苷酸全长序列(SEQ ID NO: 3)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。

30 图 4A 显示了在单用 p55 TNF 受体(标为 p55 TNFR)、p55 TNF 受体与 p35、半胱天冬蛋白酶的杆状病毒抑制剂(p55+p35)或克隆 J2(p55+J2)、或 p55 TNF 受体与不能切割的 J2 突变体(标为 J*, 图 3 的 346 位 Asp 置换成 Glu)转染 HEK-293T 细胞后

克隆 J2 的功能活性, 该活性用凋亡细胞百分数表示。这些突变体在体内和体外都不能被切割。

图 4B 显示了单独的、或用 p35 或 J2 或 J2*转染后经 TNF 和环己酰亚胺处理的凋亡的 HeLa 细胞的百分数。

5 图 5A 显示了克隆 P74 5'端的 1725 个编码碱基对(SEQ ID NO: 5)。

图 5B 显示了从图 5A 的克隆 P74 的序列推导出的 574 个氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)。

图 6 显示了从登录号 RPC15-1057I20 的 PAC 克隆的推导氨基酸序列衍生的开放读框的 1428 个氨基酸(SEQ ID NO: 7)。

10 图 7 显示了从克隆 p74 的推导氨基酸序列(称为“克隆的”)衍生的开放读框的 574 个氨基酸与从 PAC 克隆 RPC15-1057I20 的推导氨基酸序列(称为“推导的”)衍生的开放读框的 1428 个氨基酸的序列对比。

图 8 显示了 PAC 克隆 RPC15-1057I20 的推导氨基酸序列(顶部序列)(SEQ ID NO: 8)的开放读框与组蛋白脱乙酰酶 A 序列(底部序列, Genbank 登录号 NP-006028.1)(SEQ ID NO: 9)的序列对比。

15 图 9A 显示了 Bid 蛋白以及 cDNA 克隆 J2、P16、P43、P70、P74 或 P79 编码的蛋白在 ^{35}S 甲硫氨酸存在时在网织红细胞裂解物中产生并在 SDS PAGE 凝胶上分离的放射自显影。

图 9B 显示了 Bid 蛋白以及 cDNA 克隆 J2、P16、P43、P70、P74 或 P79 编码的蛋白如图 9A 产生的放射自显影, 它们用来分析与在细菌中表达成其两个亚基与 GST 融合的融合蛋白形式的半胱天冬蛋白酶-8 的结合。分子量标记的位置显示在凝胶左侧。

25 图 10 显示了部分 P43 cDNA 克隆编码的蛋白质被半胱天冬蛋白酶-8、半胱天冬蛋白酶-10、半胱天冬蛋白酶-3、半胱天冬蛋白酶-9 或半胱天冬蛋白酶-3、半胱天冬蛋白酶-9、半胱天冬蛋白酶-10 的突变体切割的结果。在所用大肠杆菌中所表达的重组半胱天冬蛋白酶的总细菌裂解物体积用相对单位(RU)表示。分子量标记的位置显示在凝胶左侧。感兴趣的蛋白质用星号作标记: 实心箭头显示了大小完整的 P43 蛋白, 空心箭头显示了切割产物。

30 图 11 显示了, 在用 p55 TNF 受体和绿色荧光蛋白(称为“PC”)有或没有克隆 J2、P16、P27、P43、P79、P74 或 P70 的 cDNA 插入物下共转染 HEK-293T 细胞后, 双杂交筛选鉴定出的 cDNA 克隆所编码的蛋白质的功能活性, 该活性表示成经历凋亡的细胞百分数。

图 12 显示了野生型 Tip60 和不可切割的突变型 Tip60 在经 p55 TNF 受体和绿色荧光蛋白共转染的 HEK-293T 细胞中的细胞死亡抑制活性, 以及缺少 N 端头 32 个氨基酸的 Δ 32-Tip60 的作用。对照细胞单用 pCGN 载体转染。

5 发明详述

本文没有详细描述分子生物学领域的许多方法, 因为这些方法是本领域技术人员众所周知的。这些方法包括定点诱变、PCR 克隆、用寡核苷酸或 cDNA 探针的噬菌体文库筛选、cDNA 的表达、重组蛋白的分析、细菌和酵母细胞的转化、哺乳动物的转染等。描述这些方法的课本例如是 Sambrook 等人的《分子克隆实验手册》Cold Spring Harbor Laboratory; ISBN: 0879693096, 1989, 《分子生物学当代方法》, F.M. Ausubel, ISBN:047150338X, 1988 和《分子生物学简短方法》, F.M. Ausubel 等人编辑, 第 3 版, John Wiley 和 Sons; ISBN:0471137812,1995。这些出版物均全部纳入本文作参考。

为了用双杂交筛选方法鉴定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白和潜在的底物, 可以采用双杂交或三杂交系统。

用于本发明方法的双杂交系统基本上如 Fields 和 Song, Nature 340,245 页, 1989 所述。较佳的, 个别载体、酵母株和文库可以作为配对双杂交系统(Matchmaker two-hybrid system)(# PT1265-1)的组件购自 Clontech(Palo Alto, USA)。

用于本发明方法的酵母双杂交系统的较佳实例在 Boldin 等人, Cell,85,803-15 页, 1996 中已有所描述。酵母双杂交系统在 Brent 等人的美国专利 5,580,736 中有进一步的描述。因此, 这些出版物均全部纳入本文作参考。

所用的三杂交系统基本上如 Tirode 等人, J. Biol. Chem, 272, 22995-9 页, 1997 中所述的那样。为了监测本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白, 需要半胱天冬蛋白酶-8 的两个亚基独立表达。出于那些目的, 半胱天冬蛋白酶-8 的两个亚基宜在不同启动子控制下分开表达。在一个较佳的实施方案中, 在可在酵母中操作的弱启动子控制下表达半胱天冬蛋白酶-8 p10 亚基(丝氨酸 375 至天冬氨酸 479), 其与 DNA 结合域的读框符合。较佳的, 该弱启动子是酵母 ADH 启动子, DNA 结合蛋白是酵母转录激活物 Gal-4 或细菌 LexA 蛋白的 DNA 结合域。ADH 启动子和 Gal4 DNA 结合域例如存在于 Clontech, Palo alto, USA 出售的 pGBD 中。然而, 本领域技术人员显然可以采用其它启动子, 只要该启动子在酵母细胞中有效即可。利用相同的标记可以采用其它 DNA 结合域, 只要这些 DNA 结合域没有转录激活功能。

长的有活性的半胱天冬蛋白酶-8 p20 亚基(丝氨酸 217 至天冬氨酸 374)在酵母细

胞中可操作的可诱导启动子的控制下表达成不融合的蛋白质。较佳的，可以采用在上文 Tirode 等人文章中描述的 Met 25 甲硫氨酸可阻遏的启动子。可诱导启动子的使用简化了用免疫沉淀和聚丙烯酰胺凝胶电泳对 p10-p20 复合物的检测。可诱导的启动子还具有其它优点，它使得对酵母细胞可能有毒性的蛋白质在酵母中得以表达，
5 因为有可能限制表达潜在毒性蛋白的期间。

用本发明方法筛选的蛋白宜以 cDNA 文库的形式提供。然而，也可采用基因组文库或组合文库。将文库克隆在酵母中可操作的转录激活结构域的 C 端。较佳的，采用酵母 Gal-4 蛋白的转录激活结构域，然而，也可采用其它许多转录激活子。较佳的，用购自 Clontech 的 pGAD GH 载体来克隆文库。

10 用于筛选的酵母株必须含有选择标记如组氨酸合成酶，其在一启动子的控制下，该启动子含有上述 DNA 结合域特异性结合的 DNA 序列。较佳的，酵母细胞还含有在一启动子控制下的报道基因，该启动子含有上述 DNA 结合域特异性结合的 DNA 序列。购自 Clontech 的酵母株 HF7c 可用来筛选 Gal-4 结合域杂交物；当用 lexA 作为 DNA 结合域时，可以采用株 L40。

15 转化后，将酵母细胞置于选择有活性细胞的条件下，接种到缺少某些氨基酸的培养基中，而这些氨基酸是其中导入质粒稳定性所需的。

培养基对于上述选择标记的基因被激活的酵母细胞是有选择性的。较佳的，选择标记是组氨酸合成酶基因。通过在缺少组氨酸的培养基中培养，可选出表达该基因的酵母细胞。该系统的一个优点是可以在生长培养基中加入组氨酸合成酶抑制剂
20 3-氨基三唑。因此，可以抑制其中表达少量组氨酸合成酶的酵母细胞，该表达由含有上述 DNA 结合域特异性结合的序列的启动子泄漏而引起。在一些克隆中，半胱天冬蛋白酶-8 p10 和/或 p20 亚基与所述克隆之间的弱的、非特异性相互作用可能使所述启动子假激活。因此，通过增加所述抑制剂在用来选择相互作用克隆的培养基中的浓度，可以选出只与某些极小长度相互作用的克隆。3-氨基三唑的浓度宜为 7.5 毫
25 摩尔。

通过定量测定其报道基因活性，对能在缺少组氨酸的培养基中生长的克隆作进一步分析。较佳的，用 lacZ 基因作为报道基因。lacZ 活性的定量测定宜在液体培养物中进行，如 Boldin 等人，J. Biol. Chem. 270, 7795-8, 1995 中所述的那样。

上述筛选方法可以类似地用双杂交试验来进行。本质的差别在于半胱天冬蛋白酶-8 的两个亚基被表达成单个肽链，它是与上述 DNA 结合域的融合蛋白。如下所
30 述，p20 亚基在其活性位点突变(半胱氨酸 360-丝氨酸 360)。

较佳的，p10 亚基与 p20 亚基通过一个接头隔开，该接头的长度宜在 10 至 50

个氨基酸之间。所述接头宜包含小的不带电荷的氨基酸，如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和缬氨酸。更佳的，接头由丝氨酸和甘氨酸残基组成。最佳的，甘氨酸残基和丝氨酸残基在所述接头中的比例约为 3: 1 至 4: 1。

用上述半胱天冬蛋白酶-8 诱饵的双杂交系统来获得克隆与上述使用三杂交系统相似，只是结合仅仅一个亚基的克隆不易与结合两个亚基的克隆或结合需要两个亚基的复合物的克隆区分开来。然而，通过评价双转化子(即转化了新鉴定的克隆和 p10 或 p20 半胱天冬蛋白酶-8 亚基的酵母细胞，其中所述亚基与 DNA 结合域融合)的 lacZ 活性，在双杂交方法中发现的任何克隆均易测试其与两个亚基的结合。与 p10 和 p20 亚基的复合物的结合也很容易评价，方法是测定三联转化子的 lacZ 活性，其中半胱天冬蛋白酶-8 的一个亚基表达成与 DNA 结合域的融合蛋白，另一个被表达成不融合蛋白。因此，显然上述三杂交系统也可用来测定在双杂交系统中发现的克隆的结合特征，因为其中使用的可诱导启动子能快速地鉴定出仅与 p10 亚基或 p10-p20 亚基复合物相互作用的克隆。

然后，选出能在缺少组氨酸的培养基中生长并表达 lacZ 活性的克隆作进一步研究。首先，测试克隆所编码的蛋白结合不相关蛋白(如核纤层蛋白)的能力。通常，弃去结合核纤层蛋白的克隆。

然后，对发现与半胱天冬蛋白酶-8 特异性相互作用的克隆作进一步分析。这用从上述筛选方法直接获得的部分克隆以及根据所述部分克隆的序列获得的全长克隆来进行。为了获得全长克隆，获得部分克隆的序列，用本领域技术人员已知的方法从酵母细胞中抽提出所述克隆的 DNA。然后，将 DNA 转化入细菌内，以获得大量纯化的可用于测序的 DNA。或者，可用限制性酶切下载体内的插入物(宜为上述 pGBD 载体)，克隆到另一载体(如购自 Stratagene 的 pBluescript)中，以便于测序。测序用链终止方法进行，较佳的是采用 United States Biochemicals 的测序试剂盒获得的 Sequenase2 酶。

然后可将如此获得的序列输入数据库搜寻程序，通过计算机搜寻鉴定出重叠的序列。所用的程序是本领域技术人员熟知的，例如包括 GCG(genetics computer group"遗传计算机组")软件包。较佳的是，采用搜寻工具，如从 EMBL 主机(例如 <http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>)获得的 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)。Blastn 命令可用来搜寻在鉴定的克隆中重叠或相似的核苷酸序列。

用本发明方法鉴定的蛋白质与 DNA 结合域的融合蛋白形式提供。因此，核酸序列应被翻译的读框是已知的，因为它必须与 DNA 结合域编码序列的读框符合。因此，用本发明鉴定的克隆的 DNA 序列能被非歧义地翻译成氨基酸序列。然后，可用

从上述 EMBL 主机获得的 Blastp 程序来鉴定重叠的蛋白序列或相似蛋白。

另外，除了上述搜寻数据库的方法外，可以筛选文库如基因组文库或 cDNA 文库，以便鉴定完整的克隆。这些筛选方法在上述 Sambrook 等人以及 Ausubel 等人的课本中有所描述。另外，可以采用以 PCR 为基础的克隆技术，如迅速扩增 cDNA 末端(5'和 3' RACE, Graham 等人, Biochem Biophys Res Commun 177, 8-16 页, 1991 及其参考文献)。

然后，进一步研究在本发明的筛选试验中鉴定的部分克隆，或用任一上述方法获得的全长克隆。是这样实现的，例如测试这些克隆对于活性半胱天冬蛋白酶-8 蛋白水解性消化的敏感性。该试验可在体内进行。为此，用产生待测试克隆编码的蛋白的表达载体以及编码第二蛋白(其表达将诱导半胱天冬蛋白酶-8 活性)的表达载体转染哺乳动物细胞系。表达载体宜包含用于表达克隆和第二蛋白的强启动子，如 Rous 肉瘤病毒(RSV, Yamamoto 等人, Cell 22,787-97 页, 1980)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV, Artelt P 等人, Gene 68 213-9 页, 1988)、巨细胞病毒(CMV, Thomsen, 等人, PNAS 81 659-63 页, 1984)，或病毒或细胞来源的类似启动子。

其表达诱导半胱天冬蛋白酶-8 活性的第二蛋白选自 Fas-胞内结构域、CD120a 胞内结构域、Mort-1、半胱天冬蛋白酶-8、或能诱导半胱天冬蛋白酶-8 活性的等价蛋白。或者，可通过 TNF 或 CD95-配体的处理将半胱天冬蛋白酶-8 活性导入细胞内。详细描述可能的机制以及此类实验其它技术细节的实验在上述 Boldin 等人, Cell 1996 中能够找到。

在将编码第二蛋白和待测蛋白的上述表达载体导入哺乳动物细胞内后，培养细胞培养物足够长的时间，以使蛋白表达、半胱天冬蛋白酶-8 激活或表达、以及待测试蛋白发生断裂。所述时期通常为 4 至 72 小时，较佳的为 16 至 30 小时，最佳的为 20 至 24 小时。为了确定断裂程度，制备全细胞裂解物。或者，可用抗标记抗体或镍-氮川三乙酸层析来纯化标记的蛋白，其试剂和详细方法可从 Qiagen GmbH, Hilden, Germany 获得。免疫沉淀技术在上述 Boldin 等人 Cell, 1996 中有所描述。免疫沉淀的试剂和说明能以试剂盒形式从 Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany 获得。

现在用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化蛋白的全细胞裂解物进行大小分辨。

现在，待测试蛋白或其标记的片段可通过 Western 印迹技术用抗标记的抗体来显示。较佳的标记是组氨酸标记与抗多组氨酸抗体的组合。然而，可采用其它的标记序列与对其有特异性的抗体的组合，只要抗体保留对标记序列有特异性，即不识别全细胞裂解物中的其它蛋白。断裂的特异性可通过运行对照反应来确认，其中在上述时间内将特异性的半胱天冬蛋白酶抑制剂加入到哺乳动物细胞培养物中。较佳

的抑制剂是选自 zVAD-fmk, zDEVD-fmk, zIETD-fmk(见 Keppler-Hafkemeyer 等人, Biochemistry 37,16934-42 页, 1998)。更佳的抑制剂是 zVAD-fmk。可采用的其它抑制剂是起半胱天冬蛋白酶细胞抑制剂作用的 Bclx 或 p35 蛋白。当这些蛋白质在试验中共同表达时的切割抑制表明切割是半胱天冬蛋白酶特异性的。

5 测试待测试蛋白是否能被半胱天冬蛋白酶-8 切割的第二种试验是体外试验, 在酶促反应中将重组产生的半胱天冬蛋白酶-8 与待测试的标记的蛋白一起使用。待测试蛋白质可以如上所述生产, 方法是将其编码序列克隆到含有强启动子的表达载体中, 并转染到哺乳动物细胞内。有利的是, 如上所述对待测试蛋白质作标记, 从而能通过抗标记抗体或能特异性结合标记序列的其它试剂将其从哺乳动物细胞抽提物
10 中纯化出来。另外, 待测试的蛋白质可用体外翻译系统来体外产生。体外翻译技术是本领域技术人员所熟知的, 其试剂和详细方法可从例如 Stratagene, La Jolla, USA 获得。

另外, 待测试蛋白质可用例如放射性同位素来标记。有利的是, 在采用同位素标记时, 体外表达待测试的蛋白质, 在体外翻译反应期间加入同位素标记的氨基酸
15 以及未标记的氨基酸。较佳的同位素是 S^{35} 。更佳的, 标记的氨基酸是 S^{35} -甲硫氨酸, 标记的和未标记的氨基酸之间的比例为 1: 1 至大约 1: 1000。

然后, 将重组产生的待测试蛋白和重组产生的半胱天冬蛋白酶-8 活性酶合并并在合适的缓冲液内, 放置足够长的时间以产生切割。较佳的缓冲液和试验的其它较佳参数在上文 Boldin 等人, Cell 1996 中有所描述。较佳的时间通常为 10 分钟至数小
20 时, 较佳的在 30 分钟和 1 小时之间。

在使切割发生后, 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳使反应物按大小分离。如果采用了同位素标记, 则可以干燥凝胶, 用照相胶片或磷光显影(phosphoimaging, Fuji)来检测同位素。对待测试蛋白质作标记, 并可在 Western 印迹中用标记特异性抗体来检测。

25 与没有半胱天冬蛋白酶-8 的对照反应相比, 在加入了半胱天冬蛋白酶-8 蛋白的反应物中出现其它低分子量条带表明受测试蛋白质被半胱天冬蛋白酶-8 切割。低分子量条带的大小还表明了切割位点的大概位置。

本发明涉及编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的 DNA 序列。

另外, 本发明还涉及编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的生物活性同种型、
30 等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物的 DNA 序列, 以及该序列编码的蛋白质、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物。这些类似物、片段、突变体和衍生物的制备是用标准程序(例如参见 Sambrook 等人, 1989),

其中在编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的 DNA 序列中,可以缺失、增加一个或多个密码子或被其它密码子取代,从而产生针对天然蛋白质有至少一个氨基酸残基变化的类似物。

在编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、同种型、等位基因变体、片段、功能类似物、突变体或衍生物的上述本发明 DNA 序列中,本发明的一个实施方案还包括能与从天然半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的编码区衍生的 cDNA 序列杂交的 DNA 序列,其中这种杂交在中等严谨条件下进行,且可杂交的 DNA 序列编码了具有生物活性的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。这些可杂交的 DNA 序列包括与天然半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白 cDNA 序列有相当高度同源性的 DNA 序列,以及代表了半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白样序列的 DNA 序列,这些序列例如是编码各种半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白同种型的天然衍生的序列,或编码属于半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白样序列组的蛋白、且编码的蛋白具有半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白活性的天然存在的序列。另外,这些序列还可以包括,例如,非天然存在的合成产生的序列,这些序列与天然的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白 cDNA 序列相似,但是掺入了许多需要的修饰。因此,这些合成的序列包括编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白类似物、片段和衍生物的所有可能的序列,所有这些均具有半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的活性。

如本文所用的,严谨条件是杂交试验中所用的温度、单价阳离子的摩尔浓度以及杂交溶液中甲酰胺百分数的函数。为了确定涉及任何给定系列条件的严谨程度,首先采用了 Meinkoth 等人(1984)的方程式来测定 100%相同性的杂交物的稳定性,该稳定性表示成 DNA-DNA 杂交物的解链温度 T_m :

$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6(\text{Log}M) + 0.41(\%GC) - 0.61\%(\text{form}) - 500/L$, 其中 M 是单价阳离子的摩尔浓度, $\%GC$ 是 DNA 中 G 和 C 核苷酸的百分数, $\%\text{form}$ 是杂交溶液中甲酰胺的百分数, L 是杂交物的碱基对长度。 T_m 从 100%相同的杂交物计算值每减少 1°C , 允许错配的数量就增加约 1%。因此,如果在指定盐浓度和甲酰胺浓度下的任何给定杂交实验的 T_m 比 100%杂交物根据 Meinkoth 方程式计算出的 T_m 低 10°C , 则即使有高达约 10%的错配,也会发生杂交。

“中等严谨条件”是提供的 T_m 比含靶序列的理想双链体的 T_m (用上式计算出或实际测得)低不超过 20°C 的那些条件。没有限制,中等严谨条件(比计算出的或测得的杂交物的 T_m 低 $15-20^{\circ}\text{C}$)是在低于计算出的杂交物的 T_m 的合适温度下采用 $2\times$ SSC(标准柠檬酸盐溶液)和 0.5%SDS(十二烷基硫酸钠)的洗涤条件。条件的最终严谨度主要取决于洗涤条件,特别是如果所用的杂交条件是允许稳定性较差的杂交物能

和稳定的杂交物一起形成的那些条件。然后,较高严谨度的洗涤条件除去了稳定性较低的杂交物。可以和上述中等严谨洗涤条件一起使用的常见的杂交条件是在比 T_m 低约 20-25°C 的温度下,在 $6\times$ SSC(或 $6\times$ SSPE(标准磷酸盐溶液-EDTA))、 $5\times$ Denhardt's 试剂、0.5%SDS、100 微克/毫升变性的、片段化鲑精 DNA 的溶液中杂交。

5 如果采用混合的探针,则宜用四甲基氯化铵(TMAC)来代替 SSC(Ausubel, 1987,1999)。

为了获得上述各种天然存在的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白样序列,可以用天然的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白 cDNA 或其部分作为探针,采用从各种组织中筛选和分离天然衍生的 DNA 或 RNA 样品的标准程序(例如参见 Sambrook 等人 1989 中提出的标准程序)。

10 本发明涉及可用上述筛选试验鉴定的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。本发明还涉及基本对应于半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的多肽或蛋白质。术语“基本对应于”不仅包括半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白,也包括其类似物的多肽或蛋白。

基本对应于半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的类似物,是半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的氨基酸序列中一个或多个氨基酸被另一氨基酸取代、或被删除和/或插入而形成的多肽,只要所得的蛋白质基本上呈现出与它所对应的半胱天冬蛋白酶-8
15 相互作用蛋白同样或更高的生物活性。

为了基本对应于半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白,在半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白序列中的变化(如同种型)通常较小。虽然变化的数目可以多于 10 个,但较佳的不多于 10 个,更佳地不多于 5 个,最佳地不多于 3 个这样的变化。尽管任何技术
20 都可运用于发现基本对应于半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的有潜在生物学活性的蛋白质,但是一种这样的方法是对编码该蛋白质的 DNA 运用常规的诱变方法,产生一些修饰形式。然后,根据它们与各种半胱天冬蛋白酶-8 结合和在上述胞内通道的调剂/介导中调节半胱天冬蛋白酶-8 活性的能力,对这些克隆表达的蛋白加以筛选。

“保守的”变化是预计不会改变蛋白质活性的那些变化,这些变化通常是首先要筛选的,因为这些变化预计不会明显改变蛋白大小、电荷或构型,因而预计不改变蛋白质的生物特性。
25

半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的保守取代形式包括一种类似物,其中多肽中至少一个氨基酸残基被不同的氨基酸保守地取代。较佳地,这种取代是根据表 1A 中下列清单进行,这些取代可用常规实验方法来确定,从而使合成的多肽分子在保持
30 半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白生物活性的同时又具有变化的结构和功能性质。

表 IA

原来的残基	代表性的取代残基
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，另一类半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的取代形式是在多肽中删去至少一个氨基酸残基，然后再根据下表 IB 在其位置插入不同的残基。多肽中可进行的取代类型可依据对不同种类中同源蛋白之间氨基酸变化频率的分析结果，例如 Schulz 等，G.E., “蛋白质结构原理”，Springer-Verlag, New York, NY, 1978 中的表 1-2，以及 Creighton, T.E., “蛋白质:结构和分子性能”，W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA 1983 中的图 3-9 中给出的分析结果。根据这一分析，本文另外定义了保守性取代，该取代能在下列 5 组之一组中进行互换。

表 IB

- 10
- 1.小的脂族非极性或弱极性残基:Ala、Ser、Thr(Pro, Gly);

2.极性带负电荷的残基及其酰胺:Asp、Asn、Glu、Gln;

3.极性带正电荷的残基:His、Arg, Lys;

4.大的脂族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val(Cys); 和

5.大的芳族残基:Phe、Tyr、Trp。

上述括号中的 3 个氨基酸残基在蛋白质结构中有特殊作用。Gly 是唯一没有侧链的残基，因而它赋予链柔韧性。然而，这会倾向于促进形成除 α -螺旋外的二级结构。Pro，因其不同寻常的几何结构，会紧密地约束肽链，并且通常会促进类似于 β 转角的结构，而在一些例子中，Cys 能够参与二硫键的形成(二硫键的形成在蛋白质折叠中很重要)。应注意，Schulz 等(同上)将上面的第 1 和第 2 组合二为一。还应注意，Tyr，因其有形成氢键的趋势，因此与 Ser 和 Thr 等有显著的亲近关系。

根据本发明进行的保守性氨基酸取代，例如上面所陈述的，都是本领域中已知的，并且预期在氨基酸取代之后可以维持多肽的生物学和结构特性。本发明的大多数缺失和取代是那些不导致蛋白质或多肽分子特性发生根本变化的类型。“特性”以遍举方式(non-inclusive)定义为二级结构(如 α -螺旋或 β -折叠)的变化和生物活性(结合半胱天冬蛋白酶-8 和/或介导半胱天冬蛋白酶-8 对细胞死亡的效应)的变化。

可用于本发明来获得半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白类似物的在蛋白质中产生氨基酸替换的例子包括:任何已知的方法步骤，例如在授予 Mark 等的美国专利 RE 33,653、4,959,314、4,588,585 和 4,737,462；授予 Koths 等的美国专利 5,116,943；授予 Namen 等的美国专利 4,965,195；授予 Chong 等的美国专利 4,879,111；授予 Lee 等的美国专利 5,017,691 中给出的方法；以及在美国专利 No. 4,904,584(Shaw 等)中给出的用赖氨酸取代的蛋白质。

除了上述不会明显改变半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白活性的保守性取代外，那些会增加半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白类似物生物活性的保守性取代或保守性稍低而随机性较高的改变，也在本发明范围之内。

当需要证实取代或缺失的确切效果时，本领域技术人员知道，可以通过常规的结合和细胞死亡试验来评估取代、缺失等的效果。用该标准测试方法进行筛选并不需要过多的实验。

可接受的半胱天冬蛋白酶-8 类似物是至少保留和半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的能力从而介导半胱天冬蛋白酶-8 在胞内通道中的活性、或调节半胱天冬蛋白酶-8 本身活性的那些类似物。通过这种方式，可以产生具有所谓显性阴性效应的类似物，即该类似物在结合半胱天冬蛋白酶-8 方面或随后的信号传导或该结合后的其它活性方面有缺陷。例如，这些类似物可用来抑制半胱天冬蛋白酶-8 的细胞毒性作用，或增强该作用，这取决于希望增加细胞死亡还是细胞存活，并取决于这些活性中哪一个是受半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白与半胱天冬蛋白酶-8 的相互作用所调节的主要活性(见上文)，这是通过这些类似物与天然半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白竞争与半胱天冬蛋白酶-8 结合或相互作用而产生的。

在遗传水平上, 这些类似物通常可以这样制得:对编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的 DNA 中的核苷酸进行定点诱变, 从而产生编码类似物的 DNA, 随后合成 DNA 并在重组细胞培养中表达多肽。类似物通常表现出与天然存在的蛋白相同或更高的定性生物活性, Ausubel 等,《当代分子生物学方法》, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook 等,《分子克隆实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,1989。

制备本文所述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白, 或者制备能编码相同多肽但与天然序列不同的其他核苷酸序列(因为遗传密码已知的简并性允许这些变化), 都可以通过定点特异性诱变编码早先制得的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白类似物或天然半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的 DNA 来实现。定点特异性诱变可利用特异性的寡核苷酸序列来产生类似物, 其中该特异性寡核苷酸序列编码具有所需突变的 DNA 序列以及足够数目的毗邻核苷酸, 以提供具有足够大小和序列复杂度(complexity)的引物序列, 从而在被横跨的缺失相接处两侧形成稳定的双链体。通常, 较佳的是长度约 20-25 个核苷酸的引物, 在被改变序列的每一侧有约 5-10 个互补核苷酸。一般, 定点特异性诱变技术是本领域中众所周知的, 代表性的出版物例如是 Adelman 等, DNA, 2:183(1983), 该文献的公开内容纳入本文作参考。

正如人们所懂得的那样, 定点特异性诱变技术通常采用单链和双链形式存在的噬菌体载体。用于定点诱变的典型载体包括:载体如 M13 噬菌体, 例如公开在 Messing 等,《大分子和重组 DNA 的第三届 Cleveland 研讨会"Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA"》, 编者 A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981) 中, 该文献纳入本文作参考。这些噬菌体易从商业上购得, 它们的用法通常是本领域技术人员所熟知的。或者, 可用含有单链噬菌体复制起点的质粒载体来获得单链 DNA(Veira 等, Meth. Enzymol. 153: 3, 1987)。

通常, 本文所述的定点诱变这样来进行: 先获得一单链载体, 该载体序列中含有编码有关多肽的 DNA 序列。用自动化 DNA/寡核苷酸合成法制得携带所需突变序列的寡核苷酸引物。然后将该引物与含有蛋白质编码序列的单链载体退火, 然后用有 DNA 聚合作用的酶(如大肠杆菌聚合酶 I 的 Klenow 片段)作用, 完成携带突变的链的合成。这样, 突变序列和第二条链就带有所需的突变。然后用该异源双链载体转化合适的细胞(如大肠杆菌 JM101 细胞), 并选出含有携带突变序列重排的重载体的克隆。

在选出了这样的克隆后, 可以取出有突变的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白序列, 并置于合适的载体中, 该载体通常是可用于转染合适宿主的转移载体或表达载

体。

因此,利用已知的 DNA 或 RNA 扩增技术(如 PCR 和化学寡核苷酸合成技术),也可在体外、原位和/或体内检测、获得和/或修饰编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的基因或核酸。PCR 可以通过重复的 DNA 聚合酶反应来扩增(增加数目)特异性 DNA 序列。该反应可用作克隆的替代手段;而所需的只是有关核酸序列的知识。为了进行 PCR,可设计与感兴趣的序列互补的引物。然后通过自动化 DNA 合成法制得这些引物。因为引物可被设计成与基因的任何部分杂交,因此可创造一些能够容忍互补碱基对存在错配的条件。扩增这些错配区域能导致合成出诱变的产物,从而产生具有新特性的肽(即定点诱变)。另见例如 Ausubel,(同上),第 16 章。此外,通过联合互补 DNA(cDNA)合成技术,并使用反转录酶和 PCR 反应,可将 RNA 用作原料来合成催乳素受体的胞外结构域,而不经克隆。

此外,PCR 引物可设计成结合新的限制性位点或具有其他特征,如在待扩增的基因片段末端有终止密码子。在扩增的基因序列的 5'和 3'端安置限制性位点,可以使编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或其片段的基因片段按需进行设计,以便连接载体中的其他序列和/或克隆位点。

PCR 及扩增 RNA 和/或 DNA 的其它方法是本领域众所周知的,并且根据此处所讲述和给予的指导,无需过多试验就可根据本发明进行使用。已知的 DNA 或 RNA 扩增方法包括(但并不限于):聚合酶链反应(PCR)和有关的扩增方法(例如参见授予 Mullis 等的美国专利 No. 4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188;授予 Tabor 等的美国专利 4,795,699 和 4,921,794;授予 Innis 的美国专利 5,142,033;授予 Wilson 等的美国专利 5,122,464;授予 Innis 的美国专利 5,091,310;授予 Gyllenstein 等的美国专利 5,066,584;授予 Gelfand 等的美国专利 4,889,818;授予 Silver 等的美国专利 4,994,370;授予 Biswas 的美国专利 4,766,067;授予 Ringold 的美国专利 4,656,134;和 Innis 等编辑的《PCR 方法:方法和应用指南》),以及 RNA 介导的扩增方法,其中使用对靶序列反义的 RNA 作为模板来合成双链 DNA(授予 Malek 等的美国专利 No. 5,130,238,其商品名为 NASBA);以及结合了 DNA 扩增和抗体标记技术的免疫-PCR(Ruzicka 等, Science 260:487(1993); Sano 等, Science 258:120(1992); Sano 等, Biotechniques 9: 1378 (1991))。这些专利和参考文献的全部内容纳入本文作参考。

按类似的方式,半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的生物活性片段(例如任何半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或其同种型的片段),可参考上述半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白类似物所述的方式进行制备。合适的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白片段是那些保留半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的能力,并能介导半胱天冬蛋白酶-8 或

其它蛋白质与半胱天冬蛋白酶-8 直接或间接结合的生物活性的片段。因此，可以制得相对于类似物而言具有上述显性阴性或显性阳性效应的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白片段。应注意，这些片段代表了本发明的一类特殊的类似物，即，它们是衍生自全长半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白序列的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的确定部分(例如任何一种半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或其同种型获得的片段)，
5 每个片段或这样的部分具有上述任一所需活性。例如，这样的片段可以是肽。

类似地，衍生物还可通过对半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白及其类似物或片段的一个或多个氨基酸残基侧链基团进行标准修饰，或者通过将半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白及其类似物或片段偶联于其他分子(如抗体、酶、受体等)来制得，这些技术都是本领域中熟知的。因此，本文所用的术语“衍生物”覆盖了用本领域已知手段对位于残基侧链的官能团或 N-端或 C-端基团进行修饰而制得的衍生物，这些衍生物均包括在本发明内。衍生物可以具有化学分子部分，例如碳水化合物或磷酸残基，只要这样的组份具有与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白相同或更高的生物活性。
10

例如，衍生物可包括：羧基的脂族酯、羧基的酰胺(通过与氨或与伯胺或仲胺反应获得)、氨基酸残基的游离氨基与酰基部分(例如烷酰基(alkanoyl)或碳环类的芳酰基)形成的 N-酰基衍生物，或游离的羟基(例如丝氨酰或苏氨酰残基)与酰基部分形成的 O-酰基衍生物。
15

术语“衍生物”只包括那些没有一个氨基酸变成 20 种常见的天然氨基酸中的某一种氨基酸的衍生物。

20 如上所述，可用切割试验来确定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白是否被半胱天冬蛋白酶-8 切割。对切割片段进行大小分离，近似地指示出切割位置。

还可进一步确定切割位点，方法是制备待测试蛋白质的缺失突变型，并如上所述测试每个缺失突变型对于半胱天冬蛋白酶-8 切割的敏感性。缺失突变体可通过 PCR 克隆待测蛋白的所需片段来构建，用编码所述待测试蛋白质的克隆的 DNA 序列作为模板。然后将 PCR 扩增的片段克隆到表达载体中，因而必须提供 ATG 起始密码子，
25 较佳的是 Kozak 序列(Kozak, M, Nucleic Acids Res. 12 857-72 页, 1984)。关于表达蛋白质的进一步详细情况可在上述 Qiagen 有关组氨酸标记的蛋白质中找到，也可在蛋白质表达概述中找到。蛋白质表达的另一参考文献是上述的《当代方法》，具体是其中第 16 章。

30 因此，待测试蛋白质的切割位点可以这样确定：从其制备各种缺失突变体，测定被半胱天冬蛋白酶-8 切割的最小的此类缺失突变体。

鉴定切割位点的另一种方法是采用根据待测试克隆的预计蛋白质序列产生的

肽。该肽可用化学方法合成,例如 Bodanszky 和 Bodanszky,《肽合成实践》, Springer, New York, ISBN 0-387-13471-9 和 Bodanszky,《肽合成实践》, Springer, New York, ISBN 0-387-12359-4。常规肽合成还可从几家商业公司(例如 SynPep Corp., Dublin, CA USA 和 California Peptide Research, Inc., Napa, CA, USA)获得。肽还能以与其它蛋白的融合物形式或非融合形式通过表达编码它的重组 DNA 来产生,详述见上文《当代方法》的第 16 章。

为了用肽对待测试蛋白质的切割位点作图谱,将所述蛋白质的预计氨基酸序列分成区域,合成对应于每个区域的肽。另外,合成一多肽,它含有一个区域约一半氨基酸,毗邻还含有直接相邻区域的约一半氨基酸,从而重叠了两个区域之间的边界。该区域含有 5-100 个氨基酸,较佳的 9-40 个氨基酸,最佳的 20-30 个氨基酸。现在如上所述测试整个一组肽被半胱天冬蛋白酶-8 切割的敏感性。可提供大量纯的制得的肽。切割反应后,可通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳以及 UV 检测或染色显色(例如用考马斯蓝)来直接分析。另外,为了更容易检测,可用同位素末端标记来标记肽(例如参见, Shevchnko A,等人, Rapid Commun Mass Spectrom, 11, 1015-24 页, 1997)。

在完成上述肽筛选后,进一步研究现在已知包含半胱天冬蛋白酶-8 切割位点的肽,可以重复相同的方法,但是从鉴定的肽序列中选出较小的区域。

肽的实际切割位点应符合半胱天冬蛋白酶切割序列 XXXD(见 Boldin 等人, Cell 1996 和 Nicholson 等人,《杀伤型半胱天冬蛋白酶》, Trends in Biochem Sci. 22, 299-306, 1997)。通过制备一个氨基酸突变的肽并测试这些突变肽对半胱天冬蛋白酶-8 切割的敏感性,可以评价肽中每个氨基酸的构型。待突变的氨基酸宜被选自带电荷非极性氨基酸组的氨基酸(见 Lehninger, Biochemistry, Worth, NY, 1979,第 4 章)、最佳的是选自甘氨酸或丙氨酸的氨基酸代替。

通过使关键的氨基酸发生突变,就可产生结合半胱天冬蛋白酶-8、但不对其切割敏感的肽。结合可在非变性条件下用丙烯酰胺凝胶电泳通过肽-半胱天冬蛋白酶-8 复合物的大小分离来测试。

还可以构建能与半胱天冬蛋白酶-8 的活性半胱氨酸反应从而共价结合所述半胱氨酸的修饰的肽。化学领域技术人员已知的与巯基反应的试剂可用于此目的。这些试剂能可逆地结合。例如,含有巯基的试剂可以和半胱天冬蛋白酶-8 活性半胱氨酸的 SH 基团反应。形成的共价 S-S 键可通过还原来切割,例如在胞质溶胶中生理条件下,或用使 S-S 基团还原的试剂(如二硫苏糖醇)。与巯基基团反应的试剂也能不可逆地结合半胱天冬蛋白酶-8。这些试剂也容易在本领域已知的能与巯基反应的交联剂(如 PIERCE Life Sciences 目录(PIERCE, Rockford, IL, USA)pO-90 以及下页)中找到。

与巯基反应的合适基团例如是吡啶二硫基、碘乙酰氨基或马来酰亚氨基。这些基团可通过接头与肽连接，这些接头包含任选的不饱和的脂肪烃链、-O-、-S-、-NH-或芳族基团。接头可被任选地取代。

与巯基反应的基团可通过本领域已知的化学合成方法与肽连接；肽的官能团可以5 与和与巯基反应的基团接头分子的官能团反应。例如，肽序列中存在的或为了产生合适官能团而加入(在赖氨酸情况下是 ϵ -氨基)的赖氨酸残基可以异双官能交联物(例如 N- γ -马来酰亚氨丁酰氧-琥珀酰亚胺酯)反应，以产生一个肽，其中所述赖氨酸 ϵ -氨基与交联剂的 N-羟基琥珀酰亚胺基团反应，而交联剂的马来酰亚氨基保持不反应，在所述肽特异性结合所述半胱天冬蛋白酶-8 时发生的与半胱天冬蛋白酶-8 半胱氨酸10 接触时它与所述半胱氨酸的巯基反应，从而灭活了所述半胱天冬蛋白酶-8。

肽中用来和巯基反应性试剂反应的位置可以选择，以靠近发生半胱天冬蛋白酶-8 切割的氨基酸(通常是天冬氨酸)。巯基反应性基团与肽结合所依靠的接头在长度、极性基团(如羟基)、带电荷基团(如硝基和磺基基团)、芳族基团(如苯撑或苯基残基)的存在方面可以不同。接头结构中的这些差异将导致产生含有肽并与巯基反应性试15 剂共价结合的试剂，该试剂将特异性地结合半胱天冬蛋白酶-8 并与其活性半胱氨酸的巯基有效地反应。

通过将所述蛋白质或肽导入哺乳动物细胞中并测定诱导凋亡的试剂在所述细胞中的效果，还可对待测试蛋白质或其肽片段作进一步特性分析。

通过将编码待测试蛋白质的 DNA 插入载体中，可实现蛋白质或肽在哺乳动物20 细胞中的表达，其中该载体含有启动子、任选的内含子序列以及剪接供体/受体信号、还任选地包含终止序列。这些技术在上述《当代方法》16 章中有综述。

上述启动子、内含子和终止序列可在哺乳动物细胞中操作。启动子宜为强启动子，如上述的 RSV、CMV 或 MPSV 启动子。启动子也可以是 SV40 早期启动子(Everett 等人, Nucl. Acids Res. 11 2447-64 页, 1983 及其参考文献)或细胞启动子，如 β -肌动蛋白启动子或 ELF-1 启动子(Tokushige 等人, J Virol Methods. 64 73-80 页, 1997)。另外，25 还可采用杂交启动子，如 Edamatsu 等人(Gene 187, 289-94 页, 1997)描述的 lac 操纵子和人 ELF-1 α 启动子之间的杂交物、Akagi 等人(Kidney Int. 51, 1265-9 页, 1997)描述的 CMV- β 肌动蛋白杂交启动子、或 tet 操纵序列与 CMV 启动子的杂交物(Furth 等人, PNAS 91, 9302-6 页, 1994 及其参考文献)。

30 在需要表达的蛋白质的编码序列中可以插入内含子序列，该序列可以完整的序列形式(即包括剪接供体和受体位点)插入。这些内含子序列的插入能增强 RNA 稳定性，从而增强了所需蛋白质的产生。尽管理论上，合适的内含子序列可以选自任何

含有内含子的基因，但是较佳的内含子序列是 β -肌动蛋白内含子、SV 40 内含子以及 p55 TNF 受体内含子。

内含子序列可含有增强上述启动子转录的增强子元件。

通常，内含子序列还含有赋予组织特异型表达的转录或翻译控制序列。因此，
5 当希望以组织特异性方式表达本发明的蛋白质，可以有利地采用这些内含子序列。含有组织特异性增强子元件的内含子例子是位于人 5-氨基乙酰丙酸合成酶 2 基因内含子 8 中的红细胞样特异性增强子(Surinya 等人, J. Biol. Chem. 273 16798-809 页, 1998), Huang 等人, Nucl. Acids Res. 18, 937-47 页, 1990 中提供了关于用内含子序列增强蛋白质产生的理论的讨论以及内含子序列的例子。

10 转录终止序列和聚腺苷酸化信号可以加在编码希望表达的蛋白质的 DNA 的 3' 端。这些序列可以在许多或甚至大多数基因中发现。有利的是，采用 SV 40 聚腺苷酸化信号(Schek 等人, Mol Cell Biol., 5386-93 页, 1992 及其参考文献)。

用来在哺乳动物细胞中表达蛋白质的较佳载体是 pcDNAHis 载体(Invitrogen)，它含有用来驱动编码所需蛋白质的基因表达的 CMV 启动子。可采用的其它载体包
15 括 pCDNA3 或 pMPSVEH 载体。这些载体分别含有 CMV 和 MPSV 启动子。

利用待测试的蛋白质的重组表达，现在可以评价所述蛋白质对于半胱天冬蛋白酶-8 介导的凋亡信号的作用。为此，凋亡可通过诱导凋亡蛋白(如 CD120a 胞内结构域、CD95 胞内结构域、Mort-1 蛋白、半胱天冬蛋白酶-8 或其等价物)的过度表达来诱导；或通过触发 CD120a、CD95、TRAMP/DR3 或其等价受体来激活凋亡信号。
20 受体激活可通过使受体与配体接触或使受体与抗体(较佳的是多克隆抗体)交联来实现(见 Engelmann 等人, J. Biol. Chem. 265, 14497-504 页, 1990)。

尽管受体样 CD120a 的触发通常需要加入蛋白质合成抑制剂如环己酰亚胺以便得到强的凋亡信号，但是受体胞内结构域或涉及凋亡信号转导的蛋白质的过度表达却不是这样(见 Boldin 等人, Cell 85, 803 页, 1996)。关于凋亡的检测、培育时间以及
25 其它细节和该试验的参数在上文 Boldin 等人的文献中已有描述。

表达待测试蛋白质的细胞相对于不表达的细胞死亡可以用多种方法来评价，例如基于 DNA 片段化或检测凋亡特异性抗原和表位的方法。用来检测凋亡的试剂盒形式的试剂和方法可从上述 Boehringer Mannheim 和其它公司购得。

30 还可通过评价细胞的形态学外观来确定细胞死亡。凋亡性细胞死亡的特征是有波状细胞膜，且在没有细胞裂解下细胞收缩。

有利的是，在哺乳动物细胞中表达报道基因，以便提供成功转染的标记。由于转染程序本身产生一些细胞死亡(包括未被转染细胞的死亡)，因此有利的是只评价被

转染的细胞。用于此目的的较佳的报道基因是 lacZ 基因，它很容易通过用 Xgal 或表现为活性 β -半乳糖苷酶的类似试剂培育转染的细胞来检测。然而，还可采用任何其它已知的报道基因，较佳的是产物容易用简单的颜色反应(其结果可用显微镜来评价)来检测的基因。例如，绿色荧光蛋白可用来直接检测而不需要颜色反应。该报道基因需要使用荧光显微镜。

因此，通过只考虑已被转染的细胞(即表达报道基因的细胞)、计数表现出凋亡形态的细胞百分数，就可以评价特定的转染克隆以及从中表达的蛋白质对凋亡的影响。

哺乳动物细胞宜为 HeLa 细胞或人胚肾(HEK)293-T 细胞。转染宜用上述《当代方法》中描述的磷酸钙方法进行。细胞形态在转染后 1-150 小时评价，较佳的在 4-35 小时内评价，最佳的在转染后 20 小时评价。

抗体的产生

多克隆抗体宜在家兔、鸡、小鼠、大鼠、绵羊或类似的哺乳动物中产生。为了产生针对本发明蛋白或肽的抗体，如上所述通过重组 DNA 技术在哺乳动物细胞中产生蛋白质或肽。还可如上述《当代方法》16 章中所述在细菌或昆虫细胞中产生蛋白质。

将蛋白质或肽从产生它们的细胞中纯化出来。蛋白质纯化方法是本领域技术人员已知的，在上述《当代分子生物学方法》16 章以及《蛋白质科学当代方法》(Wiley and Sons Inc.)第 5 和 6 章中有详细描述。有利的是，蛋白质可以与第二蛋白(如谷胱甘肽-S-转移酶等)或序列标记(如组氨酸标记序列)的融合物形式产生。融合或标记蛋白质的使用简化了纯化程序(如上述《当代分子生物学方法》16 章以及上述 Qiagen 组氨酸标记蛋白表达和纯化试剂盒说明书中所述)。

如果蛋白质或肽已经被表达成融合蛋白的形式，则希望在用蛋白质产生抗体前切割融合伙伴，以避免产生针对融合伙伴的抗体。切割融合伙伴以及分离所需蛋白质在上述《当代分子生物学方法》16 章中有所描述。用来表达并纯化麦芽糖结合蛋白融合的重组蛋白质的载体、方法和试剂也可从商业途径获得。

在生产本发明的肽时，可能希望不除去融合伙伴，因为融合蛋白可能会刺激针对该肽的抗体产生。通常当从肽产生长度少于 50 个氨基酸的抗体时，这种考虑是恰当的。

如上所述，肽还可用化学领域已知的化学方法合成。

针对蛋白质的多克隆抗体的产生在《当代免疫学方法》Wiley and Sons Inc.的第 2 章中有所描述。针对肽的抗体的产生可能需要在方法中作些改变，因为肽与蛋白

质相比抗原性通常较低。针对肽的多克隆抗体的产生在上述《当代免疫学方法》第9章中有所描述。

单克隆抗体可以从受免疫动物(尤其是大鼠或小鼠)的脾或淋巴结的B细胞制得,方法是在有利于杂交细胞生长的条件下与无限增殖的B细胞融合。对于鼠B细胞的融合,细胞系Ag-8是较佳的。

产生单克隆抗体的技术在许多文章和课本中有所描述,例如上述的《当代免疫学方法》第2章。该书的第9章中描述了用肽免疫动物。这些动物的脾细胞或淋巴结细胞能以经蛋白质免疫的动物的脾或淋巴结细胞那样使用,来产生书中第2章描述的单克隆抗体。

用来产生单克隆抗体的技术在Kohler和Milstein, Nature 256, 495-497以及USP 4,376,110中有进一步的描述。

从抗体超变区被几乎随机的序列取代的人抗体基因库中制备抗体的方法在USP 5,840,479中有所描述。如果很难用给定的肽或蛋白质对动物免疫的话,则这些抗体是较佳的。一些结构的免疫原性很弱,即使加入佐剂和与其它蛋白质连接成融合构建物,免疫原性也很弱。如果希望使用结构与人抗体相似的抗体(例如当希望抗体在人体内具有低的免疫原性时),则USP 5,840,479中描述的抗体是更佳的。

一旦鉴定出合适的抗体,就可能需要改变其特性。例如,嵌合抗体可在生产中获得较高的得率。当希望抗体在人体内免疫原性低时,恒定区被人抗体恒定区取代的嵌合抗体是较为需要的。嵌合抗体的产生在许多出版物中有所描述,例如Cabilly等人,PNAS 81, 3273页,1984;Morrison等,PNAS 81, 6851, 1984, Boulianne等人, Nature 312, 643页, 1984, EP125023, EP 171496, EP 173494, EP184187, WO86/01533, WO 87/02671以及Harlow和Lane,《抗体实验指南》,Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。

另一类抗体是抗独特型抗体。抗独特型(抗-Id)抗体是这样一种抗体,它识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇。Id抗体可这样制得,免疫与单克隆抗体来源动物相同的物种和基因型的动物(例如小鼠品种),其中该单克隆抗体就是制备的抗-Id所针对的。受免疫动物会识别免疫用抗体的独特型决定簇,并通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id抗体)而进行应答。例如参见美国专利No. 4,699,880,该专利全部纳入本文作参考。

抗-Id抗体还可用作“免疫原”,在另一动物中诱导免疫应答,产生所谓的抗-抗-Id抗体。该抗-抗-Id与最初诱导抗-Id的单克隆抗体在表位上相同。因此,通过使用针对mAb独特型决定簇的抗体,就可鉴别出表达具有相同特异性的抗体的其它克

隆。

因此,针对本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、其类似物、片段或衍生物而产生的单克隆抗体可用于在合适的动物(如 BALB/c 小鼠)中诱导抗-Id 抗体。可用该被免疫小鼠的脾细胞产生分泌抗-Id 单克隆抗体的抗-Id 杂交瘤。此外,抗-Id 单克隆抗体还可与载体(如匙孔蛾血蓝蛋白(KLH))偶联,并用于免疫其他 BALB/c 小鼠。这些小鼠的血清含有抗-抗-Id 抗体,该抗体具有最初单克隆抗体的结合特性,对上述的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、或其类似物、片段或衍生物的表位有特异性。

这样,抗-Id 单克隆抗体具有它们自己的独特型表位,或有结构上与评价表位相似的“独特位”。

术语“抗体”还包括完整的分子及其片段,例如能够结合抗原的 Fab 和 $F(ab')_2$ 。Fab 和 $F(ab')_2$ 片段缺少完整抗体的 Fc 片段,能够更迅速地从循环系统中清除,并且与完整抗体相比具有更低的非特异性组织结合性(Wahl 等, J. Nucl. Med. 24: 316-325(1983))。

应理解,根据本文公开的用于完整抗体分子的方法,本发明中有用的 Fab 和 $F(ab')_2$ 以及其他抗体片段也可用于检测和定量测定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。这些片段通常可用木瓜酶(产生 Fab 片段)或胃蛋白酶(产生 $F(ab')_2$ 片段)通过蛋白酶水解切割产生。

如果抗体能特异性地与某分子反应从而使该分子与抗体结合,那么就称该抗体“能够结合”该分子。术语“表位”指任何分子中能被抗体识别且还能被抗体结合的部分。表位或“抗原决定簇”通常由分子表面化学活性基团(如氨基酸或糖侧链)构成,而且具有特异的三维结构特征和特异的电荷特征。

“抗原”是能被抗体结合、并且还能诱导动物产生能与该抗原表位结合的抗体的分子或分子的一部分。抗原可具有一个或多个表位。上述特异反应指抗原会以高度选择性的方式与其相应的抗体反应,而不会与大量由其他抗原引起的其他抗体反应。

本发明中有用的抗体(包括抗体片段)可用于定量或定性检测样品中的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白,或检测表达本发明半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的细胞存在与否。这可以用免疫荧光技术,利用荧光标记的抗体(见下文)并结合光学显微术、流式细胞计量术或荧光计量术检测而实现。

用于本发明的抗体(或其片段)可在组织学上被采用,例如在免疫荧光或免疫电子显微术中,用来原位检测本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。原位检测可

这样来实现：从患者体内取一份组织样品，然后将经标记的本发明抗体供给该样品。抗体(或其片段)的提供最好是通过将经标记的抗体(及其片段)施加或覆盖在生物样品上。通过采用这种步骤，不仅可以确定是否存在半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白，而且能确定其在受检组织中的分布。采用了本发明，一般技术人员容易知道，可对各
5 种组织学方法(例如染色步骤)加以改动来实现这种原位检测。

对于本发明半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的这些试验方法通常包括：使生物样品(如生物液体、组织抽提物、新收获的细胞(如淋巴细胞或白细胞)、或已在组织培养基中培育过的细胞)在能够鉴别半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的可检测标记抗体存在下进行培育，然后用本领域熟知的众多方法中的任一种方法检测抗体。

10 生物样品可以用固相支持物或载体(如硝酸纤维素)、或能固定细胞、细胞颗粒或可溶蛋白的其他固相支持物或载体来处理。然后用合适的缓冲液洗涤支持物或载体，再根据本发明上述那样用可检测的标记的抗体处理。再用缓冲液第二次洗涤固相支持物或载体，除去未结合的抗体。然后可用常规方法检测所述固相支持物或载体上所结合的标记的量。

15 “固相支持物”、“固相载体”、“固体支持物”、“固体载体”、“支持物”或“载体”指能结合抗原或抗体的任何支持物或载体。熟知的支持物或载体包括：玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙淀粉酶、天然的和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩和磁铁石。出于本发明的目的，载体的特性可以是不溶的，或在某种程度上可溶。载体材料可以有实际上所有可能的结构构型，只要偶联的分子能够
20 结合抗原或抗体。因此，支持物或载体的结构可以是球形(如在玻珠内)、圆柱形(如试管的内表面或棒的外表面)。另外，表面可以是平坦的，例如板、测试条带等。较佳的支持物或载体包括聚苯乙烯珠。本领域技术人员可知道用于结合抗体或抗原的其他许多合适的载体，或者能够通过常规实验来确定这些载体。

如上所述的本发明给定量抗体的结合活性可以用众所周知的方法来测定。本领域技术人员能够通过常规实验来确定每次测定的操作条件和最佳试验条件。
25

其他的步骤，诸如洗涤、搅拌、振荡、过滤等，可增加到试验方法中，这些步骤都是常规的或是具体情况下所需的。

本发明的抗体能够被可检测地标记的一种方法是将该抗体与酶相连，然后用于酶免疫分析(EIA)。然后，当该酶与合适的底物接触时，酶会与底物反应，从而产生
30 可被检测(例如通过分光光度分析、荧光分析、或肉眼观察)的化学物。可用于可检测地标记抗体的酶包括(但不局限于)：苹果酸脱氢酶、葡萄糖球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、

碱性磷酸酶、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-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。采用酶的生色团底物，利用比色方法就可以完成检测。检测还可以通过将酶与底物反应的程度与类似制备的标准物进行肉眼比较来实现。

- 5 检测可用其他各种免疫试验实现。例如，通过放射性标记抗体或抗体片段，就可以通过采用放射免疫分析(RIA)来检测 R-PTP 酶。关于 RIA 的清楚描述可在《分子生物学中的实验技术和生物化学》(Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology), Work, T.S.等, North Holland Publishing Company, NY(1978)中找到，尤其参见 Chard, T.所写的标题为“An Introduction to Radioimmune Assay and
10 Related Techniques(放射免疫分析和相关技术的介绍)”的章节，该文献纳入本文作参考。放射性同位素可用 g 计数器或闪烁计数器等设备或通过放射性自显影来进行检测。

还可以用荧光化合物来标记本发明的抗体。当荧光标记的抗体被暴露于适当波长的光时，就能因荧光而检测出它的存在。最常用的荧光标记化合物有异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻青蛋白(pycocyanin)、别藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺。
15

抗体还可用于发出荧光的金属(如 ^{152}E 或其他镧系金属)进行可检测地标记。这些金属可通过这些金属的螯合基团(如二乙三胺五乙酸(ETPA))与抗体连接。

还可以将抗体偶联化学发光化合物，对抗体进行可检测标记。然后，检测在化学反应过程中发光的存在来检测带有化学发光标记的抗体的存在。特别有用的化学
20 发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺(isoluminol)、热吡啶鎓酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吡啶鎓盐和草酸酯。

同样，还可以用生物发光化合物来标记本发明抗体。生物发光是在生物系统中发现的一种化学发光，其中催化性蛋白提高了化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在可通过检测发光来确定。用于标记目的的重要的生物发光化合物是萤光素、
25 萤光素酶和水母发光蛋白。

本发明的抗体分子可用于免疫计量试验，也称为“双位点”或“夹心”试验。在典型的免疫计量试验中，将一定量的未标记抗体(或抗体片段)结合于固相支持物或载体上，加入一定量的带可检测标记的可溶抗体，从而可以检测和/或定量分析在固相抗体、抗原和标记抗体之间形成的三元复合物。

30 典型的且较佳的免疫测量试验包括“正向”试验，在该试验中与固相结合抗体先与待测试样品接触，通过形成二元固相抗体-抗原复合物从而将抗原从样品中抽提出。在培育合适的时间后，洗涤固相支持物或载体以去除液体样品残余物(包括未

反应的抗原,如果有的话),然后再与含有未知量的标记抗体(其功能为“报道分子”)的溶液接触。在第二次培育使标记抗体通过未标记抗体与结合于固相支持物或载体上的抗原复合之后,第二次洗涤固相支持物或载体,除去未反应的标记抗体。

在另一种“夹心”试验(该试验可与本发明的抗原一起使用)中,使用所谓的“同时”和“反向”试验。同时试验涉及一次培育步骤,因为和固相支持物或载体结合的抗体以及标记抗体被同时加入到测试样品中。在培育结束后,洗涤固体支持物或载体以除去液体样品残余物和未复合的标记抗体。然后象常规的“正向”夹心试验那样,测定与固相支持物或载体结合的标记抗体的存在。

在“反向”试验中,分步先将标记抗体溶液加至液体样品中,然后在培育适当时间后,再加入结合在固相支持物或载体上的未标记抗体。在第二次培育后,以常规方式洗涤固相载体,使其不含被测试样品的残余物和未反应的标记抗体溶液。然后再象“同时”和“正向”试验那样,测定与固相支持物或载体结合的标记抗体的存在。

15 免疫试验

免疫试验(如 RIA 或 ELISA)的建立在许多文章、课本和其它出版物中已有描述。参见 WO 97/03998, 48 页第 4 行至 52 页第 27 行。本发明的免疫试验有两种通用形式,第一,采用固定化半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或等价肽的免疫试验可用于定量测定半胱天冬蛋白酶-8。第二,采用针对半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白表位的固定化抗体可用来定量测定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。

这些试验可用于诊断,因为在可能涉及这些途径的许多疾病或综合征中需要评价参与凋亡通道的半胱天冬蛋白酶-8 以及其它蛋白质的水平。

核酸

25 预计在本发明筛选中获得的克隆是部分克隆。如果需要,在上文已经描述了完整克隆的获得。完整克隆以及本发明筛选中最初找到的部分克隆的 DNA 序列可能有各种用途。

例如,为了控制半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的表达,可能需要在细胞内产生反义 RNA。为了这个目的,将编码半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的完整或部分 cDNA 插入上述含有启动子的表达载体中。插入 cDNA 的 3'端与启动子的 3'端毗邻,cDNA 的 5'端与启动子的 3'端被所述 cDNA 隔开。当 cDNA 在细胞中表达时,产生了不能编码蛋白的反义 RNA。反义 RNA 存在于细胞中减少了半胱天冬蛋白酶-8 相互作用

蛋白基因的细胞(基因组)拷贝数。

为了生产反义 RNA, 可采用完整的 cDNA。或者, 可采用它的片段, 其长度宜在 9 和 2000 核苷酸之间, 更佳的在 15 和 500 个核苷酸之间, 最佳的在 30 和 150 个核苷酸之间。

- 5 片段宜对应于 cDNA 5'半侧内的区域, 更佳的对应于含有 5'非翻译区和/或第一外显子区域的 5'区域, 最佳的含有 ATG 翻译起始位点。另外, 片段可以仅仅对应于 5'非翻译区的 DNA 序列。

合成的寡核苷酸可用作反义寡核苷酸。寡核苷酸宜为 DNA 寡核苷酸。反义寡核苷酸的长度宜为 9 至 150 核苷酸, 更佳的为 12 至 60 个核苷酸, 最佳的为 15 至 50
10 个核苷酸。反义寡核苷酸覆盖的区域宜包括 cDNA 的 3'非翻译区, 更佳的含有聚腺苷酸化信号或翻译终止密码子或两者。

Kumar 等人在 *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 1415-1434 页中评述了反义 RNA 的作用机理和反义工具使用的目前状况。Yeh 等人在 *J Bone Miner Res.* 13, 1870-9, 1998 中描述了反义寡核苷酸在抑制 BMP 受体合成中的用途。Meiri 等人已经在 *PNAS* 95,
15 15037-15402 页, 1998 中描述了反义寡核苷酸抑制压敏钾通道基因 Kv1.4 合成的用途。Kondo 等人在 *Oncogene* 17, 2585-91 页, 1998 中描述了反义寡核苷酸抑制 Bcl-x 合成的用途。

反义药物的治疗用途在 Stix, *Sci Am.* 279, 46 页, 50 页, 1998, Flanagan 在 *Cancer Metastasis Rev* 17, 169-76 页, 1998; Guinot 和 Temsamani 在 *Pathol Biol(Parais)* 46, 347-
20 54 页, 1998 及其参考文献中有所讨论。

在设计反义寡核苷酸时, 通常采用增强所需性能的寡核苷酸修饰。例如, 用硫代磷酸键代替天然存在于 DNA 中的磷酸酯键, 这主要是因为这些硫代磷酸酯寡核苷酸较不易被细胞酶分解。Peng 等人指出, 当采用磷酸二酯-硫代磷酸酯混合骨架时, 可能会减少硫代磷酸酯寡核苷酸的不希望的体内副作用。较佳的, 在 60%的寡核苷酸中采用 2'-甲氧基核糖核苷酸修饰。这些修饰的寡核苷酸能引起与硫代磷酸酯寡核苷酸所见可比的反义效果。Peng 等人还指出, 不能支持核糖核酸酶 H 活性的寡核苷酸类似物没有活性。
25

因此, 本发明的较佳的反义寡核苷酸具有磷酸二酯-硫代磷酸酯混合骨架。较佳的是, 在约 30-80%、最佳的约 60%的寡核苷酸中采用 2'-甲氧基核糖核苷酸修饰。

30 反义寡核苷酸还可引入其它修饰。例如, 寡核苷酸分子可以与一基团相连, 该基团任选地含有部分不饱和的脂肪族烃链以及一个或多个极性 or 带电荷基团如羧酸基团、酯基团和醇基团。另外, 寡核苷酸可以和肽结构连接, 该肽结构宜为膜亲性

(membranotropic)肽。这些经修饰的寡核苷酸更容易穿透膜，而这对于它们的功能是关键的，因此可能会显著增强它们的活性。希望到达大脑的反义药物尤其需要膜渗透率。Gerster 等人已经在 *Anal Biochem.* 262, 177-84 页, 1998 中描述了棕榈基连接的寡核苷酸。Shoji 等人已经在 *J Drug Target* 5, 261-73 页, 1998 中描述了香叶醇连接

5 连接的寡核苷酸。Soukchareun 等人已经在 *Bioconjug Chem* 9, 466-75 页, 1998 中描述了与肽(例如膜亲性肽)相连的寡核苷酸及其制备。Wang 在 *J Controlled Release* 53, 39-48 页, 1998 中描述了反义分子或将分子靶向某些细胞并增强所述细胞摄取寡核苷酸作用的其它药物的修饰。

10 核酶

给出基因的已知 mRNA 序列,就可设计核酶,它是特异性结合并切割所述 mRNA 序列的 RNA 分子(例如参见 Chen 等人, *Ann. NY Acad. Sci.* 660, 271-3, 1992, Zhao 和 Pick, *Nature* 365, 448 页, 1993, Shore 等人, *Oncogene* 8, 3183, 1993, Joseph 和 Burke, *J. Biol. Chem.* 268, 24515, 1993, Shimayama 等人, *Nucleic Acids Symp Ser* 29, 177 页, 1993,

15 Cantor 等人, *PNAS* 90, 10932 页, 1993)。

因此,可以设计出切割本发明半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白 mRNA 的编码核酶的 RNA 序列。切割位点宜位于编码区内或 5'非翻译区内,更佳的在靠近 AUG 翻译起始密码子的编码区 5'部分。

编码本发明核酶的 DNA 可通过 DNA 吸收、吸收修饰的 DNA(见下文所述的导

20 致膜通透性增强的寡核苷酸修饰和蛋白质修饰)或下文所述的病毒载体介导基因转移来导入细胞。

将半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、肽和 DNA 导入细胞

本发明提供了半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、从其衍生的肽、反义 DNA 分子和寡核苷酸。这些工具与治疗或研究有关的用途必需将它们导入活生物的细胞内。

25 出于这个目的,希望改善肽、蛋白质和寡核苷酸的膜通透性。改善寡核苷酸的膜通透性的方法在上文已有讨论。相同的原理,即用亲脂性结构衍生,也可用来产生膜通透性增强的肽和蛋白质。例如,上述的已知的膜亲性肽的序列可以加到肽或蛋白质的序列中。另外,可以用部分亲脂性的结构如上述的烃链(被至少一种极性或带电荷基团取代)来衍生肽或蛋白质。例如, Muranishi 等人在 *Pharm. Research* 8, 649, 1991

30 已经描述了肽的月桂酰衍生物。肽和蛋白质的其它修饰包括氧化甲硫氨酸残基,从而产生亚砷基团,如 Zacharia 等人, *Eur. J. Pharmacol.* 203, 353 页, 1991 所述。Zacharia

及其同事还描述了相对疏水性的肽键被其酮亚甲基异酯(COCH_2)代替的肽或衍生物。蛋白质和肽化学领域技术人员已知的这些和其它修饰增强了膜的通透性。

增强膜通透性的另一种方式是在细胞表面采用受体,例如病毒受体,以诱导肽或蛋白质的细胞吸收。特异性结合某些细胞表面分子的病毒常采用这种机制。结合后,细胞将病毒带入其内部。细胞表面分子称为病毒受体。例如,整联蛋白分子 CAR 和 AdV 已被描述成腺病毒的病毒受体,见 Hemmi 等人, Hum Gene Ther 9, 2363-73 页, 1998 及其参考文献。CD4、GPR1、GPR15 和 STRL33 分子已被鉴定为 HIV 的受体/共受体,见 Edinger 等人, Virology, 249, 367-78 页, 1998 及其参考文献。

因此,将已知结合细胞表面受体的分子和肽、蛋白质或寡核苷酸偶联将增强所述肽、蛋白质或寡核苷酸的膜通透性。形成偶联物的合适基团例子是糖、维生素、激素、细胞因子、运铁蛋白、脱唾液酸糖蛋白等分子。Low 等人美国专利 5,108,921 描述了用这些分子来增强肽、蛋白质和寡核苷酸的膜通透性以及所述偶联物的制备。

Low 及其同事还进一步指出,可用诸如叶酸或生物素之类的分子来将偶联物靶向生物体内的多个细胞,因为这些分子的受体表达是丰富的、非特异性的。

在将本发明的肽、蛋白质或寡核苷酸靶向某些种类的细胞或组织时,也可采用上述的细胞表面蛋白来增强本发明所述肽、蛋白质或寡核苷酸的膜通透性。例如,如果希望靶向癌细胞,则宜采用在那些细胞表面上更丰富表达的细胞表面蛋白。例子有叶酸受体、粘蛋白抗原 MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B 和 MUC7、糖蛋白抗原 KSA、癌胚抗原、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、HER-2/neu、以及人慢性 β -促性腺激素。Wang 等人(同上, 1998)指出采用叶酸来靶向癌细胞, Zhang 等人 Clin Cancer Res 4, 2669-76 页, 1998 指出上述其它抗原的每一种均相对丰富存在于各种癌细胞和正常细胞中。

因此,利用上述偶联技术,本发明的蛋白质、肽或寡核苷酸可以如需要的那样靶向某一类型的细胞。例如,如果需要增强淋巴细胞谱系细胞的凋亡性,则例如可利用在这些细胞上表达的 MHC II 类分子,使本发明的半胱天冬蛋白酶-8 阳性调节蛋白或肽靶向这些细胞。这可通过将针对所述 MHC II 类分子恒定区的抗体或其抗原结合位点与本发明的蛋白质或肽偶联来实现。另外,还描述了各种细胞因子的众多细胞表面受体以及其它细胞通讯分子,这些分子中有许多或多或少地以局限于组织或细胞类型的方式表达。因此,当希望靶向 T 细胞亚组时,可用 CD4 T 细胞表面分子来制备本发明的偶联物。CD4-结合分子由 HIV 病毒提供,其表面抗原 gp42 能特异性结合 CD4 分子。在治疗患有基于 T 细胞的自身免疫反应的患者(如红斑狼疮患者)中,本发明的增强凋亡作用的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或肽能有利地靶向

T 细胞。

病毒介导的细胞靶向

本发明的蛋白质、肽和反义序列可利用病毒载体来导入细胞。在上述的《当代
5 分子生物学方法》第 16 章中详细描述了为此目的而采用牛痘载体。腺病毒载体的应用
在例如 Teoh 等人, Blood 92, 4591-4601 页, 1998; Narumi 等人, Am J Respir Cell Mol
Biol 19, 936-941 页, 1998; Pederson 等人, J Gastrointest Surg 2, 283-91, 1998; Guang-Lin
等人, Transplant Proc 30, 2923-4 页, 1998 及其参考文献; Nishida 等人, Spine 23,
2437-42, 1998; Schwarzenberger 等人, J Immunol 161, 6383-9 页, 1998 和 Cao 等人, J
10 Immunol 161, 6238-44, 1998 中有所描述。用逆转录病毒转移反义序列在 Daniel 等人, J
Biomed Sci. 5, 383-94 页, 1998 中有所描述。

当采用病毒作为载体时, 通常用病毒表面蛋白来靶向病毒。由于许多病毒(如上
所述的腺病毒)在其细胞向性方面是相当非特异性的, 因此可能希望通过使用细胞类型
或组织特异性启动子来进一步赋予特异性。Griscelli 等人, Hum Gene Ther. 9 1919-28
15 页, 1998 指出用心室特异性心肌球蛋白轻链 2 启动子将由腺病毒介导转移的基因特
异性地靶向心脏。

或者, 对病毒载体进行工程改造, 使其表面上表达其它蛋白质, 或将病毒载体
的表面蛋白改成插入所需的肽序列。这样可将病毒载体加工成能表达一种或多种附
加的表位用来靶向所述病毒载体。例如, 根据本发明的指导, 可用细胞因子表位、
20 MHC II 类结合肽或衍生自归巢分子的表位来靶向病毒载体。

上述工具的应用

本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白与涉及半胱天冬蛋白酶-8 蛋白水解活
性的半胱天冬蛋白酶-8 亚基特异性地相互作用。尽管不希望受理论的束缚, 本发明
25 者认为, 本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白是半胱天冬蛋白酶-8 所涉及的信
号传导通道的“下游”元件。上游因子看来通过半胱天冬蛋白酶-8 前域(介导蛋白-
蛋白相互作用的结构域)结合。看来与众多因子广泛通讯共同形成凋亡反应可能是通
过涉及死亡效应结构域(DED)和相关结构域(如位于半胱天冬蛋白酶-8 前域内的结构
域)的蛋白-蛋白相互作用而介导的。与这些蛋白质相反, 本发明的半胱天冬蛋白酶-8
30 相互作用蛋白可能是细胞死亡过程的直接执行者之一。例如, Tip-60, 一种本发明的
半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白, 是组蛋白脱乙酰酶。因此, 该蛋白质可能直接参
与染色质结构的变化。

本发明蛋白质与半胱天冬蛋白酶-8 的相互作用可能有几种后果：第一，调节半胱天冬蛋白酶-8 的活性。这显示在本文一体内试验中，其中本发明的 J2 克隆抑制了半胱天冬蛋白酶-8 介导的凋亡。

第二，半胱天冬蛋白酶-8 相互作用可能通过阻止半胱天冬蛋白酶-8 分解而增加其活性，或是通过起抑制剂作用而减少其活性。

第三，半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的活性可以调节。在本文中通过半胱天冬蛋白酶-8 切割半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的能力而证明了这一点。这些蛋白中的一些可能通过切割而失活。然而，也有可能是蛋白质的活性发生改变，诱导出了新的活性，或是半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白通过切割被激活，正如半胱天冬蛋白酶本身那样。

因此，本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、肽、寡核苷酸和抗体可用于来调节半胱天冬蛋白酶-8 的活性。在凋亡导致过度的细胞死亡的情况下，希望下调半胱天冬蛋白酶-8。例如，在原发性少突神经胶质疾病引发的多发性硬化、自身免疫眼色素层视网膜炎、糖尿病、狼疮、I 型自身免疫心肌炎、急性肝功能衰竭(不管病因)、HCV-介导的慢性肝炎、慢性胃炎如 A 型胃炎、混合结缔组织病(MCTD)、Crohn 疾病、和溃疡性结肠炎中，已提出凋亡信号会引起体组织的破坏。因此，对于患有这些疾病的患者，下调被凋亡性细胞死亡破坏的那些细胞中的半胱天冬蛋白酶-8 活性是有益处的。

例如，在上述少突神经胶质疾病中，希望抑制少突神经胶质细胞中的半胱天冬蛋白酶-8 活性。细胞表面 G 蛋白偶联的磷脂溶血磷脂酸受体在少突神经胶质细胞和其它各种脑细胞中表达，但是不在体内其它组织中表达。因此，将本发明的肽或蛋白质靶向这些细胞。可以这样实现：将所述肽或蛋白质与磷脂溶血磷脂酸偶联，或是将特异性识别所述磷脂溶血磷脂酸受体的抗体序列导入病毒载体，从而时使所述病毒载体特异性地结合所述磷脂溶血磷脂酸受体。

类似地，可将本发明的肽或蛋白质靶向参与上述其它疾病以及凋亡性细胞死亡显示介导体内所见组织损伤的其它疾病的其它细胞类型。

同样，本发明的反义 RNA、反义寡核苷酸以及核酶可以类似方式靶向上述少突神经胶质细胞或其它疾病中的相应细胞。这样，半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的表达被抑制，而不是半胱天冬蛋白酶-8 本身的表达被抑制。许多半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白表达的抑制可能减少了半胱天冬蛋白酶-8 的凋亡效应。然而，减少某些半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的表达实际上可能会增加半胱天冬蛋白酶-8 的效应，因为某些半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白能起半胱天冬蛋白酶-8 活性的负调节

剂作用。因此，在考虑用反义寡核苷酸和反义 RNA 以及核酶进行治疗前，必须首先测试这些试剂在例如上述体内试验中的效应。

另一方面，某些情况可能需要增加半胱天冬蛋白酶-8 活性。这可能是上述同一疾病的情况，例如在全身性红斑狼疮场合。然而，待靶向的细胞类型是不同的。例如，在狼疮中，T 细胞群可能在胸腺内含有未被破坏的自身反应性细胞。因此，应将本发明的半胱天冬蛋白酶-8 上调剂靶向 T 细胞。最好是将半胱天冬蛋白酶-8 上调剂靶向自身反应性细胞。在某些疾病中，例如多发性硬化，估计某些 T 细胞克隆在疾病发展中起关键作用。因此，可通过使用特异性针对自身反应性 T 细胞克隆的 T 细胞受体可变区的一个或多个抗体，用来靶向本发明的半胱天冬蛋白酶-8 上调剂(可以是本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或肽)，将本发明的半胱天冬蛋白酶-8 上调剂靶向这些细胞。

综上所述，本发明包括含有活性物质的药物制剂，该活性物质含有本发明的一种或多种半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、肽、抗体、核酶、反义 RNA 或反义寡核苷酸。

本发明还包括一种药物组合物，它含有能感染哺乳动物细胞的病毒载体，其中所述载体含有操作性相连的启动子以及编码本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或肽、核酶、反义 RNA、反义寡核苷酸或抗体的 DNA 序列。病毒载体任选地含有与启动子操作性相连的编码序列，该序列编码位于病毒表面并能结合哺乳动物细胞表面蛋白的肽或蛋白质。表面蛋白宜为能使病毒载体被吸收的蛋白质，最好能以组织或细胞类型特异性方式表达，这样就使病毒载体的靶向得以实现。

半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、其类似物、片段或衍生物还可用来分离、鉴定和克隆同类的其它蛋白质，即参与胞内信号传导过程、结合半胱天冬蛋白酶-8 或功能上相关的蛋白酶或蛋白质的那些蛋白质。在本申请中，可采用上述酵母双杂交系统，或可采用最近开发的利用非严谨性 Southern 杂交然后 PCR 克隆的系统(Wilks 等人, 1989)。在 Wilks 等人的出版物，描述了两类推定蛋白质-酪氨酸激酶的鉴定和克隆，方法是采用非严谨性 southern 杂交，然后根据激酶基序的已知序列(一种假想的激酶序列)进行 PCR 克隆。可采用该方法，根据本发明使用半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的序列来鉴定并克隆有关的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的那些序列。

利用本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、或其类似物、片段或衍生物的另一方法是在亲和层析方法中用它们来分离并鉴定它们能结合的其它蛋白或因子，例如参与胞内信号传导过程的其它蛋白质或因子。在本申请中，可将本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、其类似物、片段或衍生物与亲和层析基质个别连

接, 然后与细胞抽提物或怀疑参与细胞内信号传导过程的分离的蛋白质或因子接触。亲和层析步骤后, 就可洗脱、分离并鉴定出与本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或其类似物、片段或衍生物结合的其它蛋白质或因子。

如上所述, 本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白、或其类似物、片段或衍生物还可用作免疫原(抗原)来产生它的特异性抗体。这些抗体也可用于从细胞抽提物或产生半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白或其类似物或片段的转化细胞系中纯化半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白(例如人 N-乙酰-葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶或其任一种同种型)。另外, 这些抗体可用于诊断目的, 用来鉴定与半胱天冬蛋白酶-8 介导的 FAS-R 配体或 TNF 系统功能异常相关的疾病。因此, 如果这些疾病与涉及半胱天冬蛋白酶-8 蛋白或半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的功能异常胞内信号传导系统有关, 则这些抗体可用作重要的诊断工具。

应注意, 本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的分离、鉴定和特性分析可用任一熟知的标准筛选程序来进行。例如, 用这些筛选程序中的一种(下文所述的酵母双杂交程序)来鉴定半胱天冬蛋白酶-8 蛋白(见 Stanger 等人 1995), 随后是本发明的各种半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白(除了上述的以及下述共有待批专利申请中的其它各种新蛋白)。同样, 如上下文所述, 可采用其它程序如亲和层析、DNA 杂交程序等本领域熟知的技术, 来分离、鉴定和特性分析本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白, 或来分离、鉴定和特性分析能与本发明的半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白结合的其它蛋白质、因子、受体等。

20

实施例 IA

用来鉴定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的双杂交筛选

用描述成“酵母-三杂交系统”(Tirode F. 等人, 1997)的改进的酵母双杂交系统筛选半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白及其潜在的底物。采用的个别载体、酵母株和文库是从 Clontech(Palo Alto, USA)购得的 Matchmaker 双杂交系统(#PT1265-1)的组件。

使两个半胱天冬蛋白酶-8 亚基在不同启动子控制下分别表达。将短的 p10 亚基(丝氨酸 375 至天冬氨酸 479)克隆到载体 pGBT9(Clontech)中, 与酵母 Gal4 蛋白的 DNA 结合域(氨基酸 1-147, 序列编号按 Laughon 等人, 分子和细胞生物学, 4, 260-267, 1984)读框相符。长的有活性的 p20 亚基(丝氨酸 217 至天冬氨酸 374)在 360 位突变, 即将该位置的半胱氨酸变成丝氨酸(C360S), 使酶的蛋白酶活性失去。使突变从 C360S p20 亚基在正调节的 Met25 启动子控制下在缺少甲硫氨酸的培养基中表达成不融合

的蛋白(Sangsoda, Mol Gen Genet. 200, 407-14 页, 1985)。可以通过调节酵母细胞生长的

培养基中的甲硫氨酸浓度来控制启动子推动 p20 亚基表达的活性, 这样就能(1)用毒性蛋白亚基作为诱饵, 和(2)控制蛋白-蛋白相互作用对于第三方(即 p20 亚基)的依赖性。p10 和 p20 表达单元可以位于不同载体内。它们也能在同一载体内。在现在描述的实施例中, 采用改进的 pGBT9 载体 pGBT9-3H(见上述 Tirode 等人)。p20 亚基
5 宜和核定位信号一起表达成融合物。

在表达时, 在不存在甲硫氨酸时, 两个亚基在酵母细胞中相互结合。两个亚基的结合用共免疫沉淀和 Western 印迹实验证实。

克隆到 pGAD GH 载体(Durfee 等人, Genes Dev 7, 555-569)中的 B 细胞 cDNA 文库由 S. Elledge 博士赠与。该载体含有 Gal4 激活结构域(氨基酸 768-881)。该 GAL4
10 激活结构域在与 GAL4 DNA 结合域融合后足以诱导大量的 GAL4 基因转录活性, 见 Ma 和 Ptashne, Cell, 48, 847-853(1987)。

Keegan 等人(1986, 同上)描述的 GAL 上游激活位点(UAS.sub.G)在报道基因(lacZ)以及允许在酵母株 HF7c 中选择(His)的基因(购自 Clontech)的上游区域内。

用上述含有半胱天冬蛋白酶-8 的质粒转化 HF7c 培养物, 并如 Clontech 酵母程序所述的, 在缺少色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸的选择培养基中生长来选择
15 转化子酵母细胞。任选地加入高丝氨酸至 80 毫克/升。

然后用含有载体的 B 细胞文库进一步转化所述转化子培养物, 然后接种到缺少组氨酸的上述培养基(选择培养基)中。

在选择培养基中任选地添加 3-氨基三唑(组胺合成酶抑制剂)。加入抑制剂的作用是控制驱动该基因的启动子在不含半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的酵母细胞中的泄漏。在一些情况下, 弱的非特异性的相互作用可能会产生乱真的 Gal4-UAG-his
20 启动子转录, 从而导致酵母克隆在选择培养基中生长。

选出在选择培养基中生长的转化子, 抽提中其中的 DNA 质粒。然后将 DNA 转化到能在缺少亮氨酸的培养基中选择的 HB101 细菌内。

25 在细菌生长并从中抽提纯化出质粒 DNA 后, 将质粒 DNA 转化到 SFY526 酵母细胞内。然后, 将 SFY526 转化子接种到包括组氨酸并含有 Xgal 的选择培养基上, 测试其 lacZ 活性。然后用 Whatman 3MM No. 50 滤纸提升(lift)酵母菌落(关于菌落提升的描述参见上述 Sambrook 等人的课本), 然后在铝箔上放置约 20 秒, 转移到液氮中约 25 秒以冷冻酵母细胞, 置于室温下约 1 分钟以使酵母细胞融化, 置于培养皿中
30 Whatmann 3MM No. 1 滤纸上, 该滤纸预先浸泡在含有 Xgal 和 β -巯基乙醇的 Z 缓冲液(β -半乳糖苷酶反应缓冲液, 例如参见 Clontech 程序、上述 Sambrook 等人的课本或上述的《当代分子生物学方法》)中。菌落出现蓝色表明有活性的 β -半乳糖苷酶。

使半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白在该试验中放置数分钟至过夜, 较佳的 5 分钟至 3 小时, 最佳的 5 分钟至 1 小时, 它通常会显示出蓝色。另外, β -半乳糖苷酶活性可以这样定量测定, 即在含有 Xgal 的培养基中液体培养, 离心除去细胞, 并用分光光度计测定培养基的吸收值。

- 5 然后进一步测试上述筛选过程中鉴定的 cDNA 克隆与其它蛋白的相互作用。测试这样进行: 将待测试克隆与不相关的蛋白(该蛋白与 DNA 激活结构域表达成融合物)一起转化到 pGAD GH 载体中。

能在缺少组氨酸的培养基中生长或显示 lacZ 活性的双转化子表明文库克隆是非特异性结合的。

- 10 至于不相关的蛋白, 可以采用已知有“粘性”的蛋白(即与其它蛋白非特异性相互作用的蛋白)以及其它不相关的蛋白。例如, 测试蛋白质与核纤层蛋白、RIP、RAIDD、TRAF2 和 MORT1 的结合。通常, 弃去与核纤层蛋白结合的蛋白质。

- 还用与 lexA DNA 结合域融合的半胱天冬蛋白酶-8 亚基 p10 来进行上述三杂交测试。较佳的载体是购自 Clontech 的 pLexA 载体。当采用 lexA 作为 DNA 结合域时,
15 应采用酵母 L40 菌株或其等价物。

在上述筛选方法中鉴定出半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白, 然后用下述的体内或体外切割试验和信号转导试验作进一步分析。

实施例 1B:

- 20 用来鉴定半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的改进的双杂交筛选诱饵

- 用改进的半胱天冬蛋白酶-8 诱饵通过酵母双杂交系统(Fields 和 Song, 1989)来进一步筛选半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白。诱饵载体 pGBT9(Clontech)表达出单链蛋白质形式的半胱天冬蛋白酶-8。为了产生与活性半胱天冬蛋白酶构型类似的诱饵蛋白, 除去前域, 使小的亚基 2(从丝氨酸 375 开始到天冬氨酸 479 为止)与 Gal4 DNA
25 结合域融合。小亚基的 C 端与大亚基 1(从丝氨酸 217 开始到天冬氨酸 374 为止)的 N 端间隔有一个 16 氨基酸的甘氨酸-丝氨酸-接头(GGGGSGGGGSGGGGSG)。这样, 通过一个分子的自发折叠, 衍生得到活性半胱天冬蛋白酶的两个亚基。将亚基 1 中活性位点的半胱氨酸突变成丝氨酸(sub 1C360S)。当象半胱天冬蛋白酶-8 一样从 pcDNAHis 载体中过度表达时, 通过测定其诱导 HEK 293-T 细胞凋亡的能力, 显示
30 出该单链半胱天冬蛋白酶-8 的过度表达在功能上与野生型半胱天冬蛋白酶-8 的过度表达相似。单链半胱天冬蛋白酶-8 的活性可通过半胱天冬蛋白酶抑制剂 p35 的共表达来封闭。

如上进行双杂交筛选，只是 pGBT9 载体(Clontech)表达出上述的单链半胱天冬蛋白酶-8。

实施例 2:

5 半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的鉴定

用实施例 1A 所述的改进的双杂交筛选鉴定出数个编码特异性半胱天冬蛋白酶-8 结合蛋白的克隆。酵母中的双杂交测试确证了克隆的结合特异性，但没有检测到与对照蛋白结合。如下所述，分离选出的 cDNA 克隆，测序，将其核苷酸序列与 Genbank 中发现的序列比较。

10 实施例 2.1

发现克隆 L1 含有部分 cDNA 序列与 Stat 1 的氨基酸 690-750 相同。Stat 1 被鉴定为结合干扰素-刺激应答元件(ISRE)和 γ 激活序列(GAS)元件的转录因子(综述见 Iffice SN, 1998)。最近，Stat 1 已显示参与组成型半胱天冬蛋白酶水平的调节(Kuiner 等人, 1997)并起半胱天冬蛋白酶-3 体外底物的作用(King P. 等人,1998)。提示切割 Stat 1 可能

15 能在调节凋亡反应本身中起作用。

实施例 2.2

发现克隆 L7 编码的部分 cDNA 与 Genbank 中发现的 EST 克隆(登录号 AA608733，未给予功能)C 端部分几乎完全匹配。

实施例 2.3

20 发现克隆 L20 与 NEFA(登录号 462693)的氨基酸 104-420 相同。NEFA 是一种新的蛋白质，它含有碱性氨基酸推定的 DNA 结合域和潜在的核靶向信号、两个螺旋-环-螺旋(HLH)基序区域，并行的 EF-手型基序、EF-手之间富含酸性氨基酸的区域以及亮氨酸拉链基序(Barnikol-Watanabe 等人, 1994)。还发现 NEFA 是一种钙结合蛋白，发现它定位于细胞质内和细胞表面上，还可在培养基中检测到。NEFA 属于核结合

25 蛋白(nucleobindin)亚家族。然而，还未明确 NEFA 的生物学作用。克隆 L20 在体外和体内均被半胱天冬蛋白酶-8 所切割。

实施例 2.4

发现克隆 L12 编码的部分 cDNA 与数据库中发现的人 EST 克隆(登录号 M62097)几乎完全匹配。体外蛋白酶试验显示，克隆 L12 被半胱天冬蛋白酶-8 体外切割。简言之，使体外合成的 ^{35}S 标记蛋白在细菌产生的半胱天冬蛋白酶-8 的存在下在蛋白酶缓冲液中培育 30-60 分钟。在 SDS-PAGE 上分离蛋白质及其片段，结果用放射自显影或磷显影显示。蛋白酶活性可以用特异性全半胱天冬蛋白酶(pancaspase)抑制剂

30

z-VAD-氟甲基酮封闭。

实施例 2.5

发现克隆 L5 编码的 cDNA 与 Tip60 蛋白(登录号 3024755)相同。Tip60(Tat 相互作用蛋白 60kDa)开始时被描述成细胞 HIV-Tat 反式激活相互作用蛋白(Kamine 等人, 5 Virology 216, 357-366, 1996), 后来显示其具有组蛋白乙酰转移酶活性(Yamamoto 和 Horikoshi, 1997)。除了增强 Tat 介导 HIV 启动子激活的作用外, Tip60 的生物学作用还有待确定。

在酵母中的双杂交测试中, 发现克隆 L5 与单独的半胱天冬蛋白酶-8 亚基 2 以及 p10-p20 复合物结合。在实施例 2.4 所述的体外蛋白酶试验中, 克隆 L5 被半胱天冬蛋白酶-8 体外切割。Tip60 在与 p55 TNF-受体在 HeLa 和 HEK 293-T 细胞内共同 10 过度表达后, Tip60 也以半胱天冬蛋白酶依赖型方式被切割。即使没有蛋白合成抑制剂的存在, 在用 TNF 处理后, 它也在 HeLa 细胞中被切割。简言之, 将蛋白质克隆到 pcDNAHis 载体(Invitrogen)中并和凋亡诱导蛋白(例如 p55 TNF-R 或半胱天冬蛋白酶-8)一起在 HEK 293-T 细胞或 HeLa 细胞中表达。24 小时后, 收获转染细胞, 将 0.5-1 15 $\times 10^6$ 细胞的全细胞裂解液施加到 SDS-PAGE 上, 随后用抗 poly-His 抗体(Sigma)进行 Western 印迹。结果用 ECL 显色。分离出编码与 Tip60 蛋白匹配的插入物的数个 cDNA 克隆。发现所有克隆(包括 Tip60 的“野生型全长”克隆)均缺少从氨基酸 94(脯氨酸)延伸至 145(苏氨酸)的片段。该部分蛋白质不是乙酰转移酶活性位点部分, 认为不是蛋白功能所必需的。发现位置 200 和 203 的天冬氨酸残基被丙氨酸残基替换的 Tip-60 突变体不能被切割。 20

实施例 2.6

发现克隆 M26 编码的部分 cDNA 与 Genbank 中发现的人 EST 克隆(登录号 C18037)几乎完全匹配。在酵母中的双杂交测试中, 发现克隆 M26 单与半胱天冬蛋白酶-8 亚基 2 结合。

25 实施例 3

半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的分离

用实施例 1B 描述的双杂交筛选鉴定出其它几个编码特异性半胱天冬蛋白酶-8 结合蛋白的克隆。如下所述, 分离选出的 cDNA 克隆, 测序并将其核苷酸序列与 Genbank 中找到的序列比较。

30 筛选 B 细胞文库(Durfee T 等人, 1993)和 Jurkat T-细胞文库。表 2 显示了第一组克隆的初始特性分析。

表 2

克隆 数个	部分/同源	来源	lacZ(SFY)	插入物长度	切割
	NEFA	所有细胞	+	650-1100	体内/体外
B33	核结合蛋白	lpr-细胞	+	2000	体内/体外
B4.2	KIAA0615	雄性脑	+++	3000	体外
B8.1	EST00156		+++	1500	体内/体外
B11	磷酸乙醇胺胞苷基转移酶		+++		体外
B17.1	H23509	婴儿脑	++	1200	
B13.1	核糖核苷二磷酸还原酶	EBV	+++	700	体外
B22	亲环蛋白 A		+	700	
B27	gbAA936350		+	2700	体内/体外
B37.1	EBV	EBV	++++	1400	
J2	AA746639	人	++++	600	体外/体内
J40	KIAA0419	雄性脑	++	2300	体外

体内：293-T 细胞和/或 HeLa 细胞

用实施例 1A 描述的酵母双杂交方法来分离出编码部分 NEFA 的部分克隆和克隆 B8.1。

5

实施例 3.1

克隆 B4(登录号 3327044)、B17(登录号 H23509)、B27(登录号 AA936350)和 J40(登录号 2887413)编码的 cDNA 插入物与各自 EST 的末端同源。

实施例 3.2

10 克隆 B11 编码的 cDNA 插入物与 CTP-磷酸乙醇胺胞苷基转移酶(ET, 登录号 D84307)的 C 端同源。ET 是参与磷脂代谢的酶, 它催化磷酸乙醇胺转变成 CDP-乙醇胺(Nakashima 等人, 1997)。经上述实施例 2.4 所述试验证实, 克隆 B11 被半胱天冬蛋白酶-8 体外切割。

实施例 3.3

15 克隆 B13 和 B37 编码的 cDNA 插入物与编码 EBV 基因组一部分的克隆(登录号 V01555)的 C 端同源。

实施例 3.4

克隆 B22 编码的 cDNA 插入物与 T 细胞亲环蛋白(登录号 Y00052)的 C 端同源。

T-细胞亲环蛋白被鉴定为是环孢菌素 A 和 FK506 的胞内受体, 并且具有内在的肽基脯氨酸顺反异构酶活性(Haendler B. 等人, 1987)。

实施例 3.5

5 克隆 B33 编码的 cDNA 插入物与核结合蛋白(登录号 2506255)的 C 端同源。核结合蛋白是一种分泌型蛋白, 具有与 DNA 和 Ca^{2+} 结合的性质, 它与实施例 3.3 所述的 NEFA 蛋白非常相似。核结合蛋白最初被描述成是增强自身免疫 lpr 小鼠脾细胞中抗 DNA 抗体产生的 55kDa 蛋白(Mirua K. 等人, 1992)。通过上述实施例 2.4 和 2.5 的试验证实, B33 能在体外和体内被半胱天冬蛋白酶-8 切割。

实施例 3.6

10 克隆 J2 含有的 600bp 插入物所编码的部分蛋白质序列在体外无细胞系统中以及细胞内表达时产生了约 20kDa 的多肽。在上述实施例 2.4 和 2.5 的试验中, 当其与 p55TNF-Rs 或半胱天冬蛋白酶-8 共同表达时, 克隆 J2 编码的多肽在体外以及在体内 HEK 293-T 细胞和 HeLa 细胞中被半胱天冬蛋白酶-8 切割。

图 2 提供了克隆 J2 的核苷酸序列和推定的氨基酸序列。

15 图 3 提供了 PCR 获得的克隆 J2 的 5'延伸序列与公开在数据库中的序列的比较和序列对比, 结果揭示克隆 J2 与人 EST(登录号)AA460869 同源, 对应于推定的人 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶和另一个克隆(L48741), 并能组成推定的全长人 N-乙酰葡萄糖胺-6-磷酸脱乙酰酶。

20 实施例 4

克隆 J2 的功能特性分析

克隆 J2 最初的功能特性分析揭示它对半胱天冬蛋白酶-8 和人 p55TNF-Rs 诱导的 HEK293-T 和 HeLa 细胞凋亡有抑制活性。J2 的表达使共转染 p55 TNF 受体的 HEK 293-T 细胞或经 TNF 和环己酰亚胺处理的 HeLa 细胞的凋亡阻遏/延迟 25-50%, 如图 3 所示。凋亡性细胞死亡的定量测定这样来进行, 方法是在所示构建物转染后 20 小时表现出凋亡形态的表达 β -半乳糖苷酶的细胞部分。数据表示成显示凋亡特征的蓝色细胞占蓝色细胞总计数(每份样品约 500 个细胞)的平均百分数。或者, 用绿色荧光蛋白作为标记, 用荧光共焦显微镜检测。

30 实施例 5

半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的克隆

用上述实施例 1B 中描述的诱饵, 通过双杂交筛选方法, 筛选出 pACT2 载体(购

自 Clontech, Palo Alto, USA)表达出的人胎盘 cDNA 文库。利用该筛选程序鉴定出编码特异性半胱天冬蛋白酶-8 结合蛋白的数个克隆。进一步研究克隆 P16、P27、P43、P70、P74 和 P79。

cDNA 克隆 P43、P16 和 P74 的 cDNA 插入物测序表明, 它们共享某些同源序列。克隆 P74 具有最长的 cDNA 插入物, 约 3000bp, 看来它编码的蛋白质具有 574 个氨基酸的推定开放读框, 预计分子量约为 68-70kDa。将上述三个 cDNA 插入物的序列与公众数据库中找到的序列比较。发现克隆 P43、P16 和 P74 的 cDNA 克隆与 Genbank 中找到的两个 EST 克隆(W04418 和 N64095)的序列有一些同源性。所有三个 cDNA 插入物的序列看来构成了同一蛋白的不同剪接同种型的 3'端。对三个 cDNA 插入物的序列进行序列对比, 确认了 P74 序列中 574 氨基酸的开放读框(如图 5 所示)。在另一公众数据库(RPCI5-1057I20; Roswell Park Cancer Institute Human PAC 文库)中鉴定的定位于人染色体 12q31 的基因组克隆中也找到了相似的序列。该 PAC 克隆的序列推导出的开放读框有 1428 个氨基酸(如图 6 所示), 它含有上述具有 574 氨基酸的开放读框。图 7 显示了克隆 P74(称为“克隆的”)的 cDNA 插入物推定氨基酸序列的开放读框与 PAC 克隆(称为“推导的”)序列推导的开放读框的序列对比。

通过克隆 P74 的推导氨基酸序列与全长 PAC 克隆的推导序列的比较, 看来对应于 P74 的全长蛋白的 5'端较长, 可能从图 6 所示 PAC 序列的第一个甲硫氨酸和开头的甲硫氨酸中的一个开始。

还发现克隆 P74 的序列显示出与小鼠和人组蛋白脱乙酰酶的高度同源区(该区域可能是含有组蛋白脱乙酰酶酶促活性位点的结构域)有显著的同源性, 提示 P74 编码的蛋白质可能共享了这些蛋白质的功能。克隆 P74 部分 cDNA 的 163-1716bp 之间的序列显示出与组蛋白脱乙酰酶 A(登录号 NP_006028)有大约 80%的同源性。克隆 P74 部分 cDNA 的 385-1707bp 之间的序列显示出与组蛋白脱乙酰酶 5(登录号 NP_005465)的序列同源。克隆 P74 部分 cDNA 的 418-1629bp 之间的序列显示出与组蛋白脱乙酰酶 mHDA1(登录号 AAD09834)的序列同源, 而克隆 P74 部分 cDNA 的 424-1551bp 之间的序列显示出与组蛋白脱乙酰酶 6(登录号 NP_006035)的序列同源。图 8 中显示了从 PAC 序列推导的全长蛋白的氨基酸序列与组蛋白脱乙酰酶 A(Genebank 登录号 NP-006028.1)氨基酸序列的序列对比。

30 实施例 6

半胱天冬蛋白酶-8 相互作用蛋白的功能特性分析

A)双杂交筛选中鉴定出的 cDNA 克隆 J2、P16、P43、P70、P74 或 P79 编码的

蛋白质, 在 35S 甲硫氨酸存在下、在 TnT T7 连接的网状细胞裂解液系统 Coupled Reticulocyte Lysate System(购自 Promega, 目录号 #L4610)中, 表达在网状细胞裂解液中, 并在 SDS-PAGE 凝胶上分离(见图 9A)。分析相同量的网状细胞裂解液表达的蛋白质, 分析其与上述实施例 1B 中半胱天冬蛋白酶-8 的两个亚基与 GST 融合并在细菌中表达的融合蛋白 GST-S1-S2(C360S)的结合。在单用 GST 珠粒 4℃培育 1 小时来预先清除后, 通过与 GST 珠粒 4℃培育 1 小时后, 使 TnT 产生的蛋白质与连接了 GST 珠粒的半胱天冬蛋白酶-8 GST-S2-S1 融合蛋白一起沉淀, 洗涤 GST 沉淀物, 通过在含有 SDS 的样品缓冲液中煮沸并用 SDS-PAGE 分离, 从珠粒分离出与半胱天冬蛋白酶-8 结合的蛋白质。这样, 就可通过放射自显影使能结合半胱天冬蛋白酶-8 构建物的蛋白质显色。与 GST-S1-S2(C360S)和 Bid(Fas 凋亡信号通道中的一种已知的邻近的半胱天冬蛋白酶-8 底物)的结合相比, 克隆 P74 编码的蛋白质看来在体外特异性地结合半胱天冬蛋白酶-8(见图 9B)。在图中, 网状细胞裂解液产生的全长蛋白质用星号作标记。

在上述实施例 1A 中描述的双杂交测试中, 发现 P74 编码的蛋白质与半胱天冬蛋白酶 8 的两个亚基编码的融合蛋白结合, 但是不与单独表达的半胱天冬蛋白酶-8 小亚基结合。相比而言, 上述实施例中提到的其它蛋白质, 如 Tip60, 却与单独表达的半胱天冬蛋白酶-8 的 S2 小亚基结合(数据未显示)。

B)用 TnT T7 连接的网状细胞裂解液系统, 在 35S 甲硫氨酸存在下, 在体外在网状细胞裂解液中表达 P43 cDNA 编码的蛋白质, 使其受在大肠杆菌中表达成组氨酸标记的亚基 2-亚基 1(S2-S1)融合蛋白的重组野生型或突变型半胱天冬蛋白酶 3、半胱天冬蛋白酶 9 或半胱天冬蛋白酶 10 切割。半胱天冬蛋白酶-8 表达成亚基 1-亚基 2(S1-S2)-组氨酸标记的融合蛋白。在蛋白酶试验中采用 1 体积和 4 体积的总细菌裂解液, 定义为 1 或 4 个相对单位(RU)(图 10)。简言之, 在细菌产生的半胱天冬蛋白酶-8 存在下, 在蛋白酶缓冲液中 37℃培育体外合成的 35S 标记蛋白 30 分钟。在 SDS-PAGE 上分离蛋白质及其片段, 结果用放射自显影或磷光显影来显示。结果表明, 用作底物的 P43cDNA 编码的蛋白质被半胱天冬蛋白酶-8 有效切割, 受半胱天冬蛋白酶-10 的切割较弱, 而且不被半胱天冬蛋白酶-3 或半胱天冬蛋白酶-9 切割(图 10)。因此, 看来该蛋白质是半胱天冬蛋白酶-8 的特异性底物。

C)为了分析新克隆的蛋白质对 TNF 受体信号传导途径诱导的凋亡性细胞死亡的作用, 将所选 cDNA 克隆到 pcDNA 3.1/His C 表达载体(购自 Invitrogen)中, 与 pcDNA3 载体(Invitrogen)中表达的 p55 TNFR 受体以及 pEGFPC1 表达载体(Clontech)表达的绿色荧光蛋白(GFP)瞬时共转染到 HEK-293-T 细胞中。将 Tip60 cDNA 和缺少 N 端开

头 32 个氨基酸的 Δ 32-Tip60 克隆到 pCGN 载体(M. Tanaka 和 W. Herr 在 Cell 60, 375-386,1990 中有所描述)中, 其中血凝素(HA)标记与 cDNA 的 N 端融合并用于相同的实验设定。

24 小时后, 在荧光显微镜下检查转染的细胞, 通过测定荧光细胞总数中显示出
5 凋亡形态的细胞数, 来对细胞死亡评分。发现克隆到 pcDNA-His 载体中的部分 cDNA 所过度表达的 P74 蛋白保护了 HEK-293-T 细胞和 HeLa 细胞不会因 p55TNF 受体(图 11)过度表达或半胱天冬蛋白酶-8 的两个融合的亚基(未显示)过度表达诱导而死亡。发现野生型 Tip60 和不能被切割的 Tip60 突变型(其中位置 200 和 203 的天冬氨酸残基被丙氨酸残基置换)保护 HEK-293-T 细胞不会因 p55 TNF 受体(图 12)过度表达诱导
10 而死亡, 而缺少 N-端开头 32 个氨基酸的 Δ 32-Tip60 没有显示出此保护作用。

在完全描述了本发明后, 本领域技术人员将会理解, 在不脱离本发明的精神和范围下无需过多实验就能在范围很广的等价参数、浓度和条件内进行同样的发明。

尽管本发明已经联系其具体实例作了描述, 但是应当知道它还能作进一步的改
15 进。本申请应当覆盖: 大致上根据本发明原理、本文公开的内容、利用本发明所属领域已知或常规技术以及如下文所附权利要求范围内提出的必要特征所作的任何变化、用途或改进。

本文中引用的所有文献, 包括期刊杂志或摘要、出版的或对应的美国或外国专利申请、授权的美国或外国专利、或任何其它文献, 包括引用文献中列举的所有数
20 据、图表和文本, 均全部纳入本文作参考。另外, 本文引用的文献中所引用的文献的全部内容也全部纳入本文作参考。

参考已知的步骤、常规的步骤、已知的方法或常规方法并不以任何方式表示承认本发明的各个方面、描述或实例已在相关技术领域予以公开、指导或提示。

前述具体实例的描述将完全揭示本发明的总体特征, 在不脱离本发明的总思路
25 下, 其它人可运用本领域技术人员所知的知识(包括本文引用的内容和参考文献)无需过多实验就很容易对这些具体的实例作变化和/或改进用于各种应用。因此, 基于本文的理论和指导, 这些变化和/或改进均应在本文所公开的实例的等价意义和范围内。

应当理解, 本文的措词或术语均只是为了便于描述, 而非限制性, 因此本说明书的措词或术语可由本领域技术人员根据本文的理论和指导结合本领域普通技术人
30 员的知识来作解释。

参考文献

- Ahmad M 等人 *Cancer Res* 1997; 57(4):615-9
- Bamikol-Watanabe S. 等人 *Biol Chom Hoppe Seyler* 1994;375(8):497-512
- Cohen OM *Biochem J* 1997;326 (Pt 1). 1- 1 6
- Duan H 等人 *Nature* 1997;385(6611):86-9
- Durfee T 等人 *Genes Dev* 1993;7(4)..SSS-69
- Femandes-Alnemri T 等人 *ProcNatiAcadSciUSA*1996;93(15):7464-9
- Fields S, Song O *Nature* 1989;340(6230):245-6
- Haendler B. 等人 *EMBO J* 1987;6(4):947-50
- Ihle JN *Cell* 1996;84(3)..331-4
- Kamine J. 等人 *Virol@* 1996;216(2):357-66
- King P 等人 *J Biol Chem* 1998;273(15)..8699-704
- Kischkel FC 等人 *EMBO J* 1995; 1 4(22);5579-88
- Kumar A 等人 *Science* 1997;278(5343):1630-2
- Quelle FW 等人 *J Biol Chem* 1995;270(35):20775-80
- MacFarlane M 等人 *JBiol Chem* 1997;272(41):25417-20
- Mittl PR 等人 *JBiol Chem* 1997;272(10):6539-47
- Miura K 等人 *Biochem Blophys Res Commun* 1992; 1 87(1),3 75 -80
- Muzio M 等人 *JBiol Chem* 1998..273(5):2926-30
- Nagata S 等人 *Cell* 1997;88(3):355-65
- Nakashima A 等人 *JBiol Chem* 1997;272(14):9567-72
- Nicholson DW 等人 *Tren& Biochem Sci* 1997;22(8):299-306
- Rotonda J 等人 *Nat Struct Siol* 1996;3(7):619-25
- Salvesen GS 等人 *Cell* 1997;91(4):443-6
- Srinivasula SM 等人 *ProcNatI AcadSciUSA*1996;93(25):14486-91
- Srinivasula SM 等人 *JBiot Chem* 1998;273(17)..10107-11
- Thornberry NA 等人 *JBiol Chem* 1997;272(29):17907-1 1
- Tirode F 等人 *J Biol Chem* 1997;272(3 7):22995-9
- Yamamoto T 等人 *JBiol Chem* 1997;272(49):30595-8
- Yang X 等人 *Mol Cell* 1998; 1(2).319-25

序列表

5 <110> D.沃勒克
 M.舒赫曼
 T.冈察洛夫
 依达研究发展有限公司

10 <120> 与半胱天冬蛋白酶-8 相互作用的蛋白质
 <130> 半胱天冬蛋白酶-8

15 <140>
 <141>

<150> 132105
 <151> 1999-09-28

20 <150> 127721
 <151> 1998-12-24

<160> 9

25 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 447
 <212> DNA
 <213> 智人

30 <400> 1
 cggcacgagg gcctgggcaa cgcccggcac acgctgggac agcaggaagt ggaagtggac 60
 ggtctgacgg cctacgtggc aggtgagcgc cctgaccac tgggtcccag gtcccagccc 120
 gcatgccagg tggcccacga cccccccaga gcctgccctc tctgtctca aggcaccaag 180
 35 acgctgagtg gcagcatagc cccaatgaac gtctgtgtcc gggcacttcc tgcaggccac 240
 aggttcagca tgaagtcggc cttgaagget gcaccttgc accccgccc gttgctgggg 300
 ctggagaaga gtaaggggac cttgacttgc gtgctgacgc agacttcgtg gtgctcgacg 360
 actcccttca cgtccaggcc acctacatct cgggtgagct ggtgtggcag gcggacgcag 420
 ctaggcagtg acaaggacct cgctga 447

40 <210> 2
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> 智人

45 <400> 2
 Arg His Glu Gly Leu Gly Asn Gly Arg His Thr Leu Gly Gln Gln Glu
 1 5 10 15
 50 Val Glu Val Asp Gly Leu Thr Ala Tyr Val Ala Gly Glu Arg Pro Asp
 20 25 30
 Pro Leu Gly Pro Arg Ser Gln Pro Ala Cys Gln Val Ala His Asp Pro

	35	40	45
	Pro Arg Ala Cys Pro Leu Cys Ser Gln Gly Thr Lys Thr Leu Ser Gly		
	50	55	60
5	Ser Ile Ala Pro Met Asn Val Cys Val Arg Ala Leu Pro Ala Gly His		
	65	70	75 80
	Arg Phe Ser Met Lys Ser Ala Leu Lys Ala Ala Ser Leu His Pro Ala		
10	85	90	95
	Gln Leu Leu Gly Leu Glu Lys Ser Lys Gly Thr Leu Thr Leu Val Leu		
	100	105	110
15	Thr Gln Thr Ser Trp Cys Ser Thr Thr Pro Phe Thr Ser Arg Pro Pro		
	115	120	125
	Thr Ser Arg Val Ser Trp Cys Gly Arg Arg Thr Gln Leu Gly Ser Asp		
	130	135	140
20	Lys Asp Leu Gly		
	145		
25	<210> 3		
	<211> 1513		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
30	<400> 3		
	ggcgcgggctc cgtctctcggc tgggggttcgt cactgggcgc gggatttggc cgccgcgggg 60		
	ctccggagcc gctcgtctcc gacacggctc acgatgcgcg gcgacagggc cggcgggggc 120		
	cccgctctcc agttcactaa ctgccggatc ctgcgcggag ggaaactgct caggaggagat 180		
	ctgtgggtgc gcgagggcgc catcttggac ccagagaagc tgttctttga ggagcggcgc 240		
35	gtggccgacg agcggcgagg ctgcgggggc cgcacatcttg ctcccggtt catcgacgtg 300		
	cagatcaacc gtggatttgg tgttgacttc tctcaagcca cggaggacgt gggttcgggg 360		
	gttgccctcg tggcccgag gatcctgtcg cacggcgta cctccttctg cccaccctg 420		
	gtcacttccc caccggaggc ttatcacaag gttgttctc agatccctgt gaagagtgg 480		
	ggtcccatg gggcaggggt cctcgggctg cacctggagg gcccttcat cagccgggag 540		
40	aagcggggcg cgcaccccgga ggcccacctc cgctccttcg aggccgatgc cttccaggac 600		
	ttgctggcca cctacgggccc cctggacaat gtccgcatcg tgacgctggc ccagagtgg 660		
	ggccgtagcc acgaagtgat ccggcgctg acggcccgtg gcatctgcgt gtccctaggg 720		
	cactcagtgg ctgacctgcg ggcggcagag gatgctgtgt ggagcggagc caccttcac 780		
	acccacctct tcaacgccat gctgccttcc caccaccgcg acccaggcat cgtggggctc 840		
45	ctgaccagcg accggctgcc cgcaggccgc tgcatttct atgggatgat tgcagatggc 900		
	acgcacacca accccgccgc cctgcggatc gccaccgtg cccatcccca ggggctgggt 960		
	ctggtcaccg atgccatccc tgccttgggc ctgggcaacg gccggcacac gctgggacag 1020		
	caggaagtgg aagtggacgg tctgacggcc tacgtggcag gtgagcgccc tgaccactg 1080		
	ggtcccagggt ccagcccgc atgccaggtg gccacgacc ccccagagc ctgccctctc 1140		
50	tgctctcaag gcaccaagac gctgagtggc agcatagccc caatgaacgt ctgtgtccgg 1200		
	cacttctgc aggccacagg ctgcagcatg gactcggccc tggaggctgc atccctgcac 1260		
	cccgccaggt tctgtgggct ggagaagagt aaggggaccc tggactttgg tgctgacgca 1320		

```

gacttcgtgg tgctcgacga ctcccttcac gtccaggcca cctacatctc gggtagagctg 1380
gtgtggcagg cggacgcagc taggcagtga caaggacctc ggctgagagg acacctggcc 1440
gcagcgggat gccatcaggg ccgggtggtt ggggagctgg tctccagggg gtgagtcggg 1500
agccctgctg gat 1513
5
<210> 4
<211> 502
<212> PRT
<213> 智人
10
<400> 4
Gly Ala Ala Pro Leu Ser Ala Gly Val Arg His Trp Ala Arg Asp Leu
1 5 10 15
15 Ala Ala Ala Gly Leu Arg Ser Arg Ser Leu Pro Thr Arg Leu Thr Met
20 25 30
Arg Gly Asp Arg Ala Gly Gly Gly Pro Val Leu Gln Phe Thr Asn Cys
35 40 45
20 Arg Ile Leu Arg Gly Gly Lys Leu Leu Arg Glu Asp Leu Trp Val Arg
50 55 60
Gly Gly Arg Ile Leu Asp Pro Glu Lys Leu Phe Phe Glu Glu Arg Arg
25 65 70 75 80
Val Ala Asp Glu Arg Arg Asp Cys Gly Gly Arg Ile Leu Ala Pro Gly
85 90 95
30 Phe Ile Asp Val Gln Ile Asn Arg Gly Phe Gly Val Asp Phe Ser Gln
100 105 110
Ala Thr Glu Asp Val Gly Ser Gly Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Ile
115 120 125
35 Leu Ser His Gly Val Thr Ser Phe Cys Pro Thr Leu Val Thr Ser Pro
130 135 140
Pro Glu Ala Tyr His Lys Val Val Pro Gln Ile Pro Val Lys Ser Gly
40 145 150 155 160
Gly Pro His Gly Ala Gly Val Leu Gly Leu His Leu Glu Gly Pro Phe
165 170 175
45 Ile Ser Arg Glu Lys Arg Gly Ala His Pro Glu Ala His Leu Arg Ser
180 185 190
Phe Glu Ala Asp Ala Phe Gln Asp Leu Leu Ala Thr Tyr Gly Pro Leu
195 200 205
50 Asp Asn Val Arg Ile Val Thr Leu Ala Pro Glu Leu Gly Arg Ser His
210 215 220

```

Glu Val Ile Arg Ala Leu Thr Ala Arg Gly Ile Cys Val Ser Leu Gly
 225 230 235 240
 5 His Ser Val Ala Asp Leu Arg Ala Ala Glu Asp Ala Val Trp Ser Gly
 245 250 255
 Ala Thr Phe Ile Thr His Leu Phe Asn Ala Met Leu Pro Phe His His
 260 265 270
 10 Arg Asp Pro Gly Ile Val Gly Leu Leu Thr Ser Asp Arg Leu Pro Ala
 275 280 285
 Gly Arg Cys Ile Phe Tyr Gly Met Ile Ala Asp Gly Thr His Thr Asn
 15 290 295 300
 Pro Ala Ala Leu Arg Ile Ala His Arg Ala His Pro Gln Gly Leu Val
 305 310 315 320
 20 Leu Val Thr Asp Ala Ile Pro Ala Leu Gly Leu Gly Asn Gly Arg His
 325 330 335
 Thr Leu Gly Gln Gln Glu Val Glu Val Asp Gly Leu Thr Ala Tyr Val
 340 345 350
 25 Ala Gly Glu Arg Pro Asp Pro Leu Gly Pro Arg Ser Gln Pro Ala Cys
 355 360 365
 Gln Val Ala His Asp Pro Pro Arg Ala Cys Pro Leu Cys Ser Gln Gly
 30 370 375 380
 Thr Lys Thr Leu Ser Gly Ser Ile Ala Pro Met Asn Val Cys Val Arg
 385 390 395 400
 35 His Phe Leu Gln Ala Thr Gly Cys Ser Met Glu Ser Ala Leu Glu Ala
 405 410 415
 Ala Ser Leu His Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Glu Lys Ser Lys Gly
 420 425 430
 40 Thr Leu Asp Phe Gly Ala Asp Ala Asp Phe Val Val Leu Asp Asp Ser
 435 440 445
 Leu His Val Gln Ala Thr Tyr Ile Ser Gly Glu Leu Val Trp Gln Ala
 45 450 455 460
 Asp Ala Ala Arg Gln Gln Gly Pro Arg Leu Arg Gly His Leu Ala Ala
 465 470 475 480
 50 Ala Gly Cys His Gln Gly Arg Val Val Gly Glu Leu Val Ser Arg Glu
 485 490 495

Val Gly Ser Pro Ala Gly

500

5 <210> 5
 <211> 1725
 <212> DNA
 <213> 智人

10 <400> 5
 gagcagctca aaactcacgt ccaggtgata aagaggtcag ccaagccgag tgagaagccc 60
 cggctgcggc agataccctc ggctgaagac ctggagacag atggcggggg accgggcccag 120
 gtggtggacg atggcctgga gcacagggag ctgggccatg ggccagaggc 180
 cccgctcctc tccagcagca cctcaggtg ttgctctggg aacagcagcg actggctggg 240
 15 cggctccccc ggggcagcac cggggacact gtgctgcttc ctctggccca ggggtgggac 300
 cggcctctgt cccgggctca gtcttcccca gccgcacctg cctcactgtc agccccagag 360
 cctgccagcc agggccgagt cctctccagc tcagagaccc ctgccaggac cctgcccttc 420
 accacagggc tgatctatga ctcggtcatg ctgaagcacc agtgctcctg cggtgacaac 480
 agcaggcacc cggagcacgc cggccgcatc cagagcatct ggtcccggct gcaggagcgg 540
 20 gggctccgga gccagtgtga gtgtctccga ggccggaagg cctccctgga agagtgcag 600
 tcggtccact ctgagcggca cgtgctcctc tacggcacca acccgctcag ccgcctcaaa 660
 ctggacaacg ggaagctggc agggctcctg gcacagcggg tgtttgtgat gctgccctgt 720
 ggtgggggtg ggggtggacac tgacaccatc tggaatgagc ttcatctctc caatgcagcc 780
 cgctggggccg ctggcagtgt cactgacctc gccttcaaag tggcttctcg tgagctaaag 840
 25 aatggtttcg ctgtggtgag gccccagga caccatgcag atcattcaac agccatgggc 900
 ttctgcttct tcaactcagt ggccatcgcc tgccggcagc tgcaacagca gagcaaggcc 960
 agcaagatcc tcattgtaga ctgggacgtg caccatggca acggcaccca gcaaaccctc 1020
 taccaagacc ccagtgtgct ctacatctcc ctgcatcgcc atgacgacgg caacttcttc 1080
 ccaggagtg gggctgtgga tgaggtaggg gctggcagcg gtgagggctt caatgtcaat 1140
 30 gtggcctggg ctggaggtct ggaccccccc atgggggata ctgagtacct ggctgctttc 1200
 aggatagtcg tgatgcccac cgcccagagc ttctctccag acctagtctt ggtgtctgtt 1260
 ggatttgatg ctgctgaggg tcacccggcc cacttggtg gctaccatgt ttctgcaaaa 1320
 tgttttgat acatgacgca gcaactgatg aacctggcag gaggcgcagt ggtgctggcc 1380
 ttggagggtg gccatgacct cacagccatc tgtgacgct ctgaggcctg tgtggctgct 1440
 35 cttctgggta acagggtgga tcccctttca gaagaaggct ggaaacagaa acccaacctc 1500
 aattccatcc gctctctgga ggccgtgata cgggtgcaca gtaaatactg gggctgcatg 1560
 cagcgctgg cctcctgtcc agactcctgg gtgcctagag tgccaggggc tgacaaagaa 1620
 gaagtggagg cagtaaccgc actggcgtcc ctctctgtgg gcatcctggc tgaagatagg 1680
 cctcgggagc agctggtgga ggaggaagaa cctatgaatc tctaa 1725

40 <210> 6
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> 智人

45 <400> 6
 Glu Gln Leu Lys Thr His Val Gln Val Ile Lys Arg Ser Ala Lys Pro
 1 5 10 15
 50 Ser Glu Lys Pro Arg Leu Arg Gln Ile Pro Ser Ala Glu Asp Leu Glu
 20 25 30

Thr Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gln Val Val Asp Asp Gly Leu Glu His
 35 40 45
 Arg Glu Leu Gly His Gly Gln Pro Glu Ala Arg Gly Pro Ala Pro Leu
 5 50 55 60
 Gln Gln His Pro Gln Val Leu Leu Trp Glu Gln Gln Arg Leu Ala Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Pro Arg Gly Ser Thr Gly Asp Thr Val Leu Leu Pro Leu Ala
 10 85 90 95
 Gln Gly Gly His Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ala
 100 105 110
 15 Pro Ala Ser Leu Ser Ala Pro Glu Pro Ala Ser Gln Ala Arg Val Leu
 115 120 125
 Ser Ser Ser Glu Thr Pro Ala Arg Thr Leu Pro Phe Thr Thr Gly Leu
 20 130 135 140
 Ile Tyr Asp Ser Val Met Leu Lys His Gln Cys Ser Cys Gly Asp Asn
 145 150 155 160
 Ser Arg His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg
 25 165 170 175
 Leu Gln Glu Arg Gly Leu Arg Ser Gln Cys Glu Cys Leu Arg Gly Arg
 180 185 190
 30 Lys Ala Ser Leu Glu Glu Leu Gln Ser Val His Ser Glu Arg His Val
 195 200 205
 Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Ser Arg Leu Lys Leu Asp Asn Gly
 35 210 215 220
 Lys Leu Ala Gly Leu Leu Ala Gln Arg Met Phe Val Met Leu Pro Cys
 225 230 235 240
 Gly Gly Val Gly Val Asp Thr Asp Thr Ile Trp Asn Glu Leu His Ser
 40 245 250 255
 Ser Asn Ala Ala Arg Trp Ala Ala Gly Ser Val Thr Asp Leu Ala Phe
 260 265 270
 45 Lys Val Ala Ser Arg Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro
 275 280 285
 Pro Gly His His Ala Asp His Ser Thr Ala Met Gly Phe Cys Phe Phe
 50 290 295 300
 Asn Ser Val Ala Ile Ala Cys Arg Gln Leu Gln Gln Gln Ser Lys Ala

	305		310		315		320
	Ser Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn Gly Thr						
		325		330		335	
5	Gln Gln Thr Phe Tyr Gln Asp Pro Ser Val Leu Tyr Ile Ser Leu His						
		340		345		350	
10	Arg His Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly Ala Val Asp Glu						
		355		360		365	
	Val Gly Ala Gly Ser Gly Glu Gly Phe Asn Val Asn Val Ala Trp Ala						
		370		375		380	
15	Gly Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Pro Glu Tyr Leu Ala Ala Phe						
		385		390		395	
	Arg Ile Val Val Met Pro Ile Ala Arg Glu Phe Ser Pro Asp Leu Val						
		405		410		415	
20	Leu Val Ser Ala Gly Phe Asp Ala Ala Glu Gly His Pro Ala Pro Leu						
		420		425		430	
	Gly Gly Tyr His Val Ser Ala Lys Cys Phe Gly Tyr Met Thr Gln Gln						
25		435		440		445	
	Leu Met Asn Leu Ala Gly Gly Ala Val Val Leu Ala Leu Glu Gly Gly						
		450		455		460	
30	His Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala Cys Val Ala Ala						
		465		470		475	
	Leu Leu Gly Asn Arg Val Asp Pro Leu Ser Glu Glu Gly Trp Lys Gln						
		485		490		495	
35	Lys Pro Asn Leu Asn Ser Ile Arg Ser Leu Glu Ala Val Ile Arg Val						
		500		505		510	
	His Ser Lys Tyr Trp Gly Cys Met Gln Arg Leu Ala Ser Cys Pro Asp						
40		515		520		525	
	Ser Trp Val Pro Arg Val Pro Gly Ala Asp Lys Glu Glu Val Glu Ala						
		530		535		540	
45	Val Thr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Val Gly Ile Leu Ala Glu Asp Arg						
		545		550		555	
	Pro Ser Glu Gln Leu Val Glu Glu Glu Glu Pro Met Asn Leu						
		565		570			
50							

<211> 1428
 <212> PRT
 <213> 智人

5 <400> 7
 Met Phe Ala Arg Ser Ala Gly Leu Cys Phe Pro Trp Val Pro Gly Val
 1 5 10 15

10 Ser His Gly Gly Asp Ala Glu Glu Val Leu Ala Gln His Pro Thr Pro
 20 25 30

Thr Gly Arg Gly Ala Glu Arg Arg Pro Arg Pro Pro Asp Ser Ser Ala
 35 40 45

15 Glu Gly Asp Pro Gly Met Leu Lys Pro Cys Gly Cys Val Pro Ser Pro
 50 55 60

Gln Lys Val Ala Leu Lys Val Gly Ala Pro Phe Cys Thr Cys Gly Cys
 65 70 75 80

20 Phe Gln Arg Phe His Leu Pro Lys Ala Cys Pro Gly Gln Gln Gly Ser
 85 90 95

25 Pro Glu Ser Ala Arg Pro Arg Asn Arg Gln Pro Tyr Ala Thr Gln Asn
 100 105 110

Gly Pro Ala Pro Arg Pro Gln Val Leu Pro Gly Ser Ser Ser Arg Cys
 115 120 125

30 Cys His Gly Tyr Ile Cys Phe Leu Phe Asp Ser Ser Gln Thr Ala Glu
 130 135 140

Val Glu Val Gly Trp Gly Gly Asp Thr Gly Ser Gln Leu Arg Pro Leu
 145 150 155 160

35 Leu Arg Gly Ala Val Tyr Asn Ser Arg Met Trp Asp Ser Gln Lys Glu
 165 170 175

40 Asp Ser Lys Pro Asp Ile Leu Arg Leu Gln Asn Thr Gln Leu Phe His
 180 185 190

Ser Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Thr Gln Val Ser Pro Gly Ala His
 195 200 205

45 Tyr Cys Ser Pro Thr Gly Ala Gly Cys Pro Arg Pro Cys Ala Asp Thr
 210 215 220

Pro Gly Pro Gln Pro Gln Pro Met Asp Leu Arg Val Gly Gln Arg Pro
 225 230 235 240

50 Pro Val Glu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Leu Leu Ala Leu Gln Arg Pro
 245 250 255

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

Pro Ala Ser Gly Cys Ser Ser Pro Asn Asp Ser Glu His Gly Pro Asn
 530 535 540
 Pro Ile Leu Gly Ser Glu Ala Leu Leu Gly Gln Arg Leu Arg Leu Gln
 5 545 550 555 560
 Glu Thr Ser Val Ala Pro Phe Ala Leu Pro Thr Val Ser Leu Leu Pro
 565 570 575
 10 Ala Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Pro Ala Arg Ala Asp Ser Asp Arg
 580 585 590
 Arg Thr His Pro Thr Leu Gly Pro Arg Gly Pro Ile Leu Gly Ser Pro
 595 600 605
 15 His Thr Pro Leu Phe Leu Pro His Gly Leu Glu Pro Glu Ala Gly Gly
 610 615 620
 Thr Leu Pro Ser Arg Leu Gln Pro Ile Leu Leu Leu Asp Pro Ser Gly
 20 625 630 635 640
 Ser His Ala Pro Leu Leu Thr Val Pro Gly Leu Gly Pro Leu Pro Phe
 645 650 655
 25 His Phe Ala Gln Ser Leu Met Thr Thr Glu Arg Leu Ser Gly Ser Gly
 660 665 670
 Leu His Trp Pro Leu Ser Arg Thr Arg Ser Glu Pro Leu Pro Pro Ser
 675 680 685
 30 Ala Thr Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Met Gln Pro Arg Leu Glu Gln
 690 695 700
 Leu Lys Thr His Val Gln Val Ile Lys Arg Ser Ala Lys Pro Ser Glu
 35 705 710 715 720
 Lys Pro Arg Leu Arg Gln Ile Pro Ser Ala Glu Asp Leu Glu Thr Asp
 725 730 735
 40 Gly Gly Gly Pro Gly Gln Val Val Asp Asp Gly Leu Glu His Arg Glu
 740 745 750
 Leu Gly His Gly Gln Pro Glu Ala Arg Gly Pro Ala Pro Leu Gln Gln
 755 760 765
 45 His Pro Gln Val Leu Leu Trp Glu Gln Gln Arg Leu Ala Gly Arg Leu
 770 775 780
 Pro Arg Gly Ser Thr Gly Asp Thr Val Leu Leu Pro Leu Ala Gln Gly
 50 785 790 795 800
 Gly His Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala

	805	810	815
	Ser Leu Ser Ala Pro Glu Pro Ala Ser Gln Ala Arg Val Leu Ser Ser		
	820	825	830
5	Ser Glu Thr Pro Ala Arg Thr Leu Pro Phe Thr Thr Gly Leu Ile Tyr		
	835	840	845
	Asp Ser Val Met Leu Lys His Gln Cys Ser Cys Gly Asp Asn Ser Arg		
10	850	855	860
	His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg Leu Gln		
	865	870	875
15	Glu Arg Gly Leu Arg Ser Gln Cys Glu Cys Leu Arg Gly Arg Lys Ala		
	885	890	895
	Ser Leu Glu Glu Leu Gln Ser Val His Ser Glu Arg His Val Leu Leu		
20	900	905	910
	Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Ser Arg Leu Lys Leu Asp Asn Gly Lys Leu		
	915	920	925
	Ala Gly Leu Leu Ala Gln Arg Met Phe Val Met Leu Pro Cys Gly Gly		
25	930	935	940
	Val Gly Pro Leu Ala Thr Leu Ser Ala Phe Leu Ala Ser Leu Ala Pro		
	945	950	955
30	Thr Val Pro Gln Gly Leu Ser Arg Val Ser Trp Gly Leu Lys Pro Pro		
	965	970	975
	Pro Gly Pro Asn Pro Lys Ser Arg Pro Ala Pro Cys Pro Trp Gly Pro		
35	980	985	990
	Gly Arg Gly Val Gly Thr Thr Pro Leu Gly Pro Gly Ser Cys Val Lys		
	995	1000	1005
	Pro Trp Met Met Arg Ala Leu Thr Leu Ala Pro Gln Val Asp Thr Asp		
40	1010	1015	1020
	Thr Ile Trp Asn Glu Leu His Ser Ser Asn Ala Ala Arg Trp Ala Ala		
	1025	1030	1035
45	Gly Ser Val Thr Asp Leu Ala Phe Lys Val Ala Ser Arg Glu Leu Lys		
	1045	1050	1055
	Asn Gly Phe Ala Val Val Arg Pro Pro Gly His His Ala Asp His Ser		
50	1060	1065	1070
	Thr Ala Met Gly Phe Cys Phe Phe Asn Ser Val Ala Ile Ala Cys Arg		
	1075	1080	1085

	Gln	Leu	Gln	Gln	Gln	Ser	Lys	Ala	Ser	Lys	Ile	Leu	Ile	Val	Asp	Trp
	1090					1095					1100					
5	Asp	Val	His	His	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Gln	Thr	Phe	Tyr	Gln	Asp	Pro
	1105				1110				1115						1120	
	Ser	Val	Leu	Tyr	Ile	Ser	Leu	His	Arg	His	Asp	Asp	Gly	Asn	Phe	Phe
				1125					1130					1135		
10	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Val	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly
				1140				1145						1150		
	Phe	Asn	Val	Asn	Val	Ala	Trp	Ala	Gly	Gly	Leu	Asp	Pro	Pro	Met	Gly
15		1155					1160					1165				
	Asp	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Ala	Phe	Arg	Ile	Val	Val	Met	Pro	Ile	Ala
	1170					1175					1180					
20	Arg	Glu	Phe	Ser	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Phe	Asp	Ala
	1185				1190						1195				1200	
	Ala	Glu	Gly	His	Pro	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Tyr	His	Val	Ser	Ala	Lys
				1205					1210					1215		
25	Cys	Phe	Gly	Tyr	Met	Thr	Gln	Gln	Leu	Met	Asn	Leu	Ala	Gly	Gly	Ala
			1220					1225						1230		
	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Gly	Gly	His	Asp	Leu	Thr	Ala	Ile	Cys	Asp
30		1235					1240					1245				
	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Val	Asp	Pro
	1250				1255						1260					
35	Leu	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Lys	Gln	Lys	Pro	Asn	Leu	Asn	Ala	Ile	Arg
	1265				1270					1275					1280	
	Ser	Leu	Glu	Ala	Val	Ile	Arg	Val	His	Ser	Lys	Cys	Gly	Asp	Gly	Thr
				1285				1290						1295		
40	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	Lys	Asp	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	His	Arg
			1300					1305					1310			
	Gly	Gln	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Cys	Gln	Pro	Gly	Asp	Leu	Leu	Leu	Val
45		1315					1320					1325				
	Trp	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ser	Asp	Pro	Gly	Ser	Asn	Gly	Glu	His	Pro
	1330				1335					1340						
50	Pro	Val	Arg	Gly	Tyr	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Ala
	1345				1350					1355					1360	

Tyr Gln Thr Val Ala Pro Gln Gly Lys Tyr Trp Gly Cys Met Gln Arg
 1365 1370 1375
 Leu Ala Ser Cys Pro Asp Ser Trp Val Pro Arg Val Pro Gly Ala Asp
 5 1380 1385 1390
 Lys Glu Glu Val Glu Ala Val Thr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Val Gly
 1395 1400 1405
 10 Ile Leu Ala Glu Asp Arg Pro Ser Glu Gln Leu Val Glu Glu Glu Glu
 1410 1415 1420
 Pro Met Asn Leu
 1425
 15
 <210> 8
 <211> 1200
 <212> PRT
 20 <213> 智人
 <400> 8
 Pro Gln Pro Gln Pro Met Asp Leu Arg Val Gly Gln Arg Pro Pro Val
 1 5 10 15
 25 Glu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Leu Leu Ala Leu Gln Arg Pro Gln Arg
 20 25 30
 Leu His His His Leu Phe Leu Ala Gly Leu Gln Gln Gln Arg Ser Val
 30 35 40 45
 Glu Pro Met Arg Val Lys Met Glu Leu Pro Ala Cys Gly Ala Thr Leu
 50 55 60
 35 Ser Leu Val Pro Ser Leu Pro Ala Phe Ser Ile Pro Arg His Gln Ser
 65 70 75 80
 Gln Ser Ser Thr Pro Cys Pro Phe Leu Gly Cys Arg Pro Cys Pro Gln
 85 90 95
 40 Leu Ser Met Asp Thr Pro Met Pro Glu Leu Gln Val Gly Pro Gln Glu
 100 105 110
 Gln Glu Leu Arg Gln Leu Leu His Lys Asp Lys Ser Lys Arg Ser Lys
 45 115 120 125
 Glu Val Ala Thr Pro Ala Gln Pro Ser Pro Thr Ser Gln Val Pro Ala
 130 135 140
 50 Ala Ala Cys Val Ala Cys Ala Val Ala Ser Ser Val Val Lys Gln Lys
 145 150 155 160

	Leu	Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Gln	Gln	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Thr	
					165				170					175			
5	Val	His	Pro	Asn	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro	Tyr	Arg	Ser	Gln	Gly	Pro	Cys	
				180				185					190				
	Ser	Gly	Gln	Cys	Pro	Cys	Ser	Val	Pro	Thr	Pro	Leu	Lys	Gln	Pro	Trp	
			195				200					205					
10	His	Ser	Phe	Cys	Arg	Thr	Leu	Glu	Pro	Leu	Glu	Thr	Glu	Gly	Ala	Thr	
		210				215					220						
	Arg	Ser	Met	Leu	Ser	Ser	Phe	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	
	225					230				235					240		
15	Asp	Pro	Pro	Glu	His	Phe	Pro	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	Pro	Asn	
				245				250					255				
	Leu	Lys	Leu	Arg	Tyr	Lys	Pro	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Arg	Arg	Lys	Asn	
20			260				265					270					
	Pro	Leu	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Ala	Pro	Pro	Ser	Leu	Arg	Arg	Arg	Pro	
		275				280					285						
25	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Ala	
		290				295					300						
	Ser	Gly	Cys	Ser	Ser	Pro	Asn	Asp	Ser	Glu	His	Gly	Pro	Asn	Pro	Ile	
	305				310					315				320			
30	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Leu	Gln	Glu	Thr	
				325				330					335				
	Ser	Val	Ala	Pro	Phe	Ala	Leu	Pro	Thr	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Ile	
35			340				345					350					
	Thr	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Ala	Asp	Ser	Asp	Arg	Arg	Thr	
		355				360					365						
40	His	Pro	Thr	Leu	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Ile	Leu	Gly	Ser	Pro	His	Thr	
		370				375					380						
	Pro	Leu	Phe	Leu	Pro	His	Gly	Leu	Glu	Pro	Glu	Ala	Gly	Gly	Thr	Leu	
	385				390					395					400		
45	Pro	Ser	Arg	Leu	Gln	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Gly	Ser	His	
				405				410					415				
	Ala	Pro	Leu	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	Phe	His	Phe	
50			420				425					430					
	Ala	Gln	Ser	Leu	Met	Thr	Thr	Glu	Arg	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	His	

	435	440	445	
	Trp Pro Leu Ser Arg Thr Arg Ser Glu Pro Leu Pro Pro Ser Ala Thr			
	450	455	460	
5	Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Met Gln Pro Arg Leu Glu Gln Leu Lys			
	465	470	475	480
	Thr His Val Gln Val Ile Lys Arg Ser Ala Lys Pro Ser Glu Lys Pro			
10		485	490	495
	Arg Leu Arg Gln Ile Pro Ser Ala Glu Asp Leu Glu Thr Asp Gly Gly			
		500	505	510
15	Gly Pro Gly Gln Val Val Asp Asp Gly Leu Glu His Arg Glu Leu Gly			
	515	520	525	
	His Gly Gln Pro Glu Ala Arg Gly Pro Ala Pro Leu Gln Gln His Pro			
20	530	535	540	
	Gln Val Leu Leu Trp Glu Gln Gln Arg Leu Ala Gly Arg Leu Pro Arg			
	545	550	555	560
	Gly Ser Thr Gly Asp Thr Val Leu Leu Pro Leu Ala Gln Gly Gly His			
25		565	570	575
	Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ser Leu			
		580	585	590
30	Ser Ala Pro Glu Pro Ala Ser Gln Ala Arg Val Leu Ser Ser Ser Glu			
	595	600	605	
	Thr Pro Ala Arg Thr Leu Pro Phe Thr Thr Gly Leu Ile Tyr Asp Ser			
35	610	615	620	
	Val Met Leu Lys His Gln Cys Ser Cys Gly Asp Asn Ser Arg His Pro			
	625	630	635	640
	Glu His Ala Gly Arg Ile Gln Ser Ile Trp Ser Arg Leu Gln Glu Arg			
40		645	650	655
	Gly Leu Arg Ser Gln Cys Glu Cys Leu Arg Gly Arg Lys Ala Ser Leu			
		660	665	670
45	Glu Glu Leu Gln Ser Val His Ser Glu Arg His Val Leu Leu Tyr Gly			
	675	680	685	
	Thr Asn Pro Leu Ser Arg Leu Lys Leu Asp Asn Gly Lys Leu Ala Gly			
50	690	695	700	
	Leu Leu Ala Gln Arg Met Phe Val Met Leu Pro Cys Gly Gly Val Gly			
	705	710	715	720

	Pro Leu Ala Thr Leu Ser Ala Phe Leu Ala Ser Leu Ala Pro Thr Val	
	725	730 735
5	Pro Gln Gly Leu Ser Arg Val Ser Trp Gly Leu Lys Pro Pro Pro Gly	
	740	745 750
	Pro Asn Pro Lys Ser Arg Pro Ala Pro Cys Pro Trp Gly Pro Gly Arg	
	755	760 765
10	Gly Val Gly Thr Thr Pro Leu Gly Pro Gly Ser Cys Val Lys Pro Trp	
	770	775 780
	Met Met Arg Ala Leu Thr Leu Ala Pro Gln Val Asp Thr Asp Thr Ile	
15	785	790 795 800
	Trp Asn Glu Leu His Ser Ser Asn Ala Ala Arg Trp Ala Ala Gly Ser	
	805	810 815
20	Val Thr Asp Leu Ala Phe Lys Val Ala Ser Arg Glu Leu Lys Asn Gly	
	820	825 830
	Phe Ala Val Val Arg Pro Pro Gly His His Ala Asp His Ser Thr Ala	
	835	840 845
25	Met Gly Phe Cys Phe Phe Asn Ser Val Ala Ile Ala Cys Arg Gln Leu	
	850	855 860
	Gln Gln Gln Ser Lys Ala Ser Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val	
30	865	870 875 880
	His His Gly Asn Gly Thr Gln Gln Thr Phe Tyr Gln Asp Pro Ser Val	
	885	890 895
35	Leu Tyr Ile Ser Leu His Arg His Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly	
	900	905 910
	Ser Gly Ala Val Asp Glu Val Gly Ala Gly Ser Gly Glu Gly Phe Asn	
	915	920 925
40	Val Asn Val Ala Trp Ala Gly Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Pro	
	930	935 940
	Glu Tyr Leu Ala Ala Phe Arg Ile Val Val Met Pro Ile Ala Arg Glu	
45	945	950 955 960
	Phe Ser Pro Asp Leu Val Leu Val Ser Ala Gly Phe Asp Ala Ala Glu	
	965	970 975
50	Gly His Pro Ala Pro Leu Gly Gly Tyr His Val Ser Ala Lys Cys Phe	
	980	985 990

	Gly Tyr Met Thr Gln Gln Leu Met Asn Leu Ala Gly Gly Ala Val Val
	995 1000 1005
5	Leu Ala Leu Glu Gly Gly His Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser
	1010 1015 1020
	Glu Ala Cys Val Ala Ala Leu Leu Gly Asn Arg Val Asp Pro Leu Ser
	1025 1030 1035 1040
10	Glu Glu Gly Trp Lys Gln Lys Pro Asn Leu Asn Ala Ile Arg Ser Leu
	1045 1050 1055
	Glu Ala Val Ile Arg Val His Ser Lys Cys Gly Asp Gly Thr Leu Ala
	1060 1065 1070
15	Glu Leu Arg Leu Lys Asp Leu Gly Gly Thr Leu Pro His Arg Gly Gln
	1075 1080 1085
	Ile Leu Gly Phe Arg Cys Gln Pro Gly Asp Leu Leu Leu Val Trp Ser
20	1090 1095 1100
	Lys Ile Pro Val Ser Asp Pro Gly Ser Asn Gly Glu His Pro Pro Val
	1105 1110 1115 1120
25	Arg Gly Tyr Pro Leu Ser Pro Pro Asp Gly Ala Ser Arg Ala Tyr Gln
	1125 1130 1135
	Thr Val Ala Pro Gln Gly Lys Tyr Trp Gly Cys Met Gln Arg Leu Ala
	1140 1145 1150
30	Ser Cys Pro Asp Ser Trp Val Pro Arg Val Pro Gly Ala Asp Lys Glu
	1155 1160 1165
	Glu Val Glu Ala Val Thr Ala Leu Ala Ser Leu Ser Val Gly Ile Leu
35	1170 1175 1180
	Ala Glu Asp Arg Pro Ser Glu Gln Leu Val Glu Glu Glu Glu Pro Met
	1185 1190 1195 1200
40	
	<210> 9
45	<211> 1041
	<212> PRT
	<213> 智人
	<400> 9
50	Pro Ser Ala Val Pro Met Asp Leu Arg Leu Asp His Gln Phe Ser Leu
	1 5 10 15

	Pro Val Ala Glu Pro Ala Leu Arg Glu Gln Gln Leu Gln Gln Glu Leu	
	20 25 30	
5	Leu Ala Leu Lys Gln Lys Gln Gln Ile Gln Arg Gln Ile Leu Ile Ala	
	35 40 45	
	Glu Phe Gln Arg Gln His Glu Gln Leu Ser Arg Gln His Glu Ala Gln	
	50 55 60	
10	Leu His Glu His Ile Lys Gln Gln Gln Glu Met Leu Ala Met Lys His	
	65 70 75 80	
	Gln Gln Glu Leu Leu Glu His Gln Arg Lys Leu Glu Arg His Arg Gln	
	85 90 95	
15	Glu Gln Glu Leu Glu Lys Gln His Arg Glu Gln Lys Leu Gln Gln Leu	
	100 105 110	
	Lys Asn Lys Glu Lys Gly Lys Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Glu Val	
20	115 120 125	
	Lys Met Lys Leu Gln Glu Phe Val Leu Asn Lys Lys Lys Ala Leu Ala	
	130 135 140	
25	His Arg Asn Leu Asn His Cys Ile Ser Ser Asp Pro Arg Tyr Trp Tyr	
	145 150 155 160	
	Gly Lys Thr Gln His Ser Ser Leu Asp Gln Ser Ser Pro Pro Gln Ser	
	165 170 175	
30	Gly Val Ser Thr Ser Tyr Asn His Pro Val Leu Gly Met Tyr Asp Ala	
	180 185 190	
	Lys Asp Asp Phe Pro Leu Arg Lys Thr Ala Ser Glu Pro Asn Leu Lys	
35	195 200 205	
	Leu Arg Ser Arg Leu Lys Gln Lys Val Ala Glu Arg Arg Ser Ser Pro	
	210 215 220	
40	Leu Leu Arg Arg Lys Asp Gly Pro Val Val Thr Ala Leu Lys Lys Arg	
	225 230 235 240	
	Pro Leu Asp Val Thr Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ala Pro Gly Ser Gly	
	245 250 255	
45	Pro Ser Ser Pro Asn Asn Ser Ser Gly Ser Val Ser Ala Glu Asn Gly	
	260 265 270	
	Ile Ala Pro Ala Val Pro Ser Ile Pro Ala Glu Thr Ser Leu Ala His	
50	275 280 285	
	Arg Leu Val Ala Arg Glu Gly Ser Ala Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Thr	

	290	295	300	
	Ser Pro Ser Leu Pro Asn Ile Thr Leu Gly Leu Pro Ala Thr Gly Pro			
	305	310	315	320
5	Ser Ala Gly Thr Ala Gly Gln Gln Asp Thr Glu Arg Leu Thr Leu Pro			
		325	330	335
	Ala Leu Gln Gln Arg Leu Ser Leu Phe Pro Gly Thr His Leu Thr Pro			
10		340	345	350
	Tyr Leu Ser Thr Ser Pro Leu Glu Arg Asp Gly Gly Ala Ala His Ser			
		355	360	365
15	Pro Leu Leu Gln His Met Val Leu Leu Glu Gln Pro Pro Ala Gln Ala			
		370	375	380
	Pro Leu Val Thr Gly Leu Gly Ala Leu Pro Leu His Ala Gln Ser Leu			
20		385	390	395
	Val Gly Ala Asp Arg Val Ser Pro Ser Ile His Lys Leu Arg Gln His			
		405	410	415
	Arg Pro Leu Gly Arg Thr Gln Ser Ala Pro Leu Pro Gln Asn Ala Gln			
25		420	425	430
	Ala Leu Gln His Leu Val Ile Gln Gln Gln His Gln Gln Phe Leu Glu			
		435	440	445
30	Lys His Lys Gln Gln Phe Gln Gln Gln Gln Leu Gln Met Asn Lys Ile			
		450	455	460
	Ile Pro Lys Pro Ser Glu Pro Ala Arg Gln Pro Glu Ser His Pro Glu			
35		465	470	475
	Glu Thr Glu Glu Glu Leu Arg Glu His Gln Ala Leu Leu Asp Glu Pro			
		485	490	495
	Tyr Leu Asp Arg Leu Pro Gly Gln Lys Glu Ala His Ala Gln Ala Gly			
40		500	505	510
	Val Gln Val Lys Gln Glu Pro Ile Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Glu			
		515	520	525
45	Pro Pro Arg Glu Val Glu Pro Gly Gln Arg Gln Pro Ser Glu Gln Glu			
		530	535	540
	Leu Leu Phe Arg Gln Gln Ala Leu Leu Leu Glu Gln Gln Arg Ile His			
50		545	550	555
	Gln Leu Arg Asn Tyr Gln Ala Ser Met Glu Ala Ala Gly Ile Pro Val			
		565	570	575

	Ser Phe Gly Gly His Arg Pro Leu Ser Arg Ala Gln Ser Ser Pro Ala	
	580	585 590
5	Ser Ala Thr Phe Pro Val Ser Val Gln Glu Pro Pro Thr Lys Pro Arg	
	595	600 605
	Phe Thr Thr Gly Leu Val Tyr Asp Thr Leu Met Leu Lys His Gln Cys	
	610	615 620
10	Thr Cys Gly Ser Ser Ser Ser His Pro Glu His Ala Gly Arg Ile Gln	
	625	630 635 640
	Ser Ile Trp Ser Arg Leu Gln Glu Thr Gly Leu Arg Gly Lys Cys Glu	
15		645 650 655
	Cys Ile Arg Gly Arg Lys Ala Thr Leu Glu Glu Leu Gln Thr Val His	
	660	665 670
20	Ser Glu Ala His Thr Leu Leu Tyr Gly Thr Asn Pro Leu Asn Arg Gln	
	675	680 685
	Lys Leu Asp Ser Lys Lys Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ser Val Phe Val	
	690	695 700
25	Arg Leu Pro Cys Gly Gly Val Gly Val Asp Ser Asp Thr Ile Trp Asn	
	705	710 715 720
	Glu Val His Ser Ala Gly Ala Ala Arg Leu Ala Val Gly Cys Val Val	
30		725 730 735
	Glu Leu Val Phe Lys Val Ala Thr Gly Glu Leu Lys Asn Gly Phe Ala	
	740	745 750
35	Val Val Arg Pro Pro Gly His His Ala Glu Glu Ser Thr Pro Met Gly	
	755	760 765
	Phe Cys Tyr Phe Asn Ser Val Ala Val Ala Ala Lys Leu Leu Gln Gln	
	770	775 780
40	Arg Leu Ser Val Ser Lys Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His	
	785	790 795 800
	Gly Asn Gly Thr Gln Gln Ala Phe Tyr Ser Asp Pro Ser Val Leu Tyr	
45		805 810 815
	Met Ser Leu His Arg Tyr Asp Asp Gly Asn Phe Phe Pro Gly Ser Gly	
	820	825 830
50	Ala Pro Asp Glu Val Gly Thr Gly Pro Gly Val Gly Phe Asn Val Asn	
	835	840 845

	Met Ala Phe Thr Gly Gly Leu Asp Pro Pro Met Gly Asp Ala Glu Tyr	
	850	855 860
5	Leu Ala Ala Phe Arg Thr Val Val Met Pro Ile Ala Ser Glu Phe Ala	
	865	870 875 880
	Pro Asp Val Val Leu Val Ser Ser Gly Phe Asp Ala Val Glu Gly His	
		885 890 895
10	Pro Thr Pro Leu Gly Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Arg Cys Phe Gly Tyr	
		900 905 910
	Leu Thr Lys Gln Leu Met Gly Leu Ala Gly Gly Arg Ile Val Leu Ala	
		915 920 925
15	Leu Glu Gly Gly His Asp Leu Thr Ala Ile Cys Asp Ala Ser Glu Ala	
		930 935 940
	Cys Val Ser Ala Leu Leu Gly Asn Glu Leu Asp Pro Leu Pro Glu Lys	
20		945 950 955 960
	Val Leu Gln Gln Arg Pro Asn Ala Asn Ala Val Arg Ser Met Glu Lys	
		965 970 975
25	Val Met Glu Ile His Ser Lys Tyr Trp Arg Cys Leu Gln Arg Thr Thr	
		980 985 990
	Ser Thr Ala Gly Arg Ser Leu Ile Glu Ala Gln Thr Cys Glu Asn Glu	
		995 1000 1005
30	Glu Ala Glu Thr Val Thr Ala Met Ala Ser Leu Ser Val Gly Val Lys	
		1010 1015 1020
	Pro Ala Glu Lys Arg Pro Asp Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Pro Pro	
35		1025 1030 1035 1040
	Leu	

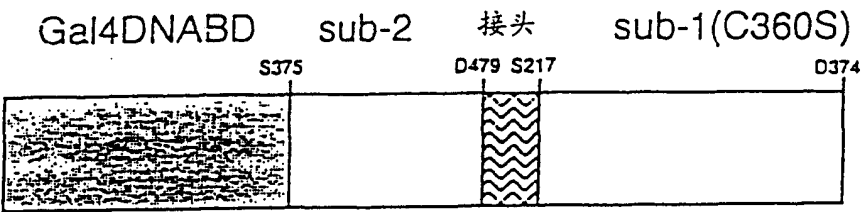


图 1

1/1
CGG CAC GAG GGC CTG GGC AAC GGC CGG CAC ACG CTG GGA CAG CAG GAA GTG GAA GTG GAC
R H E G L G N G R H T L G Q Q E V E V D
61/21
GGT CTG ACG GCC TAC GTG GCA GGT GAG CGC CCT GAC CCA CTG GGT CCC AGG TCC CAG CCC
G L T A Y V A G E R P D P L G P R S Q P
121/41
GCA TGC CAG GTG GCC CAC GAC CCC CCC AGA GCC TGC CCT CTC TGC TCT CAA GGC ACC AAG
A C Q V A H D P P R A C P L C S Q G T K
181/61
ACG CTG AGT GGC AGC ATA GCC CCA ATG AAC GTC TGT GTC CGG GCA cTT cTt GCA GGC CAC
T L S G S I A P M N V C V R A L P A G H
241/81
AGG TTC AGC ATG AAG TCG GCC TTG AAG GCT GCA TCC TTG CAC CCC GCC CAG TTG CTG GCG
R F S M K S A L K R A S L H P A Q L L G
301/101
CTG gAG AAG AGT AAG GGG ACC TTG ACT TTG GTG CTG ACG CAG ACT TCG TGG TGC TCG ACG
L E K S K G T L T L V L T Q T S W C S T
361/121
ACT CCC TTC ACG TCC AGG CCA CCT ACA TCT CGG GTG AGC TGG TGT GGC AGG CGG ACG CAG
T P F T S R P P T S R V S W C G R R T Q
421/141
CTA GGC AGT GAC AAG GAC CTC GGC TGA
L S S D K D L G *

```

1/1                               31/11
ggc gcg gct ccg ctc tcg gct ggg gtt cgt cac tgg gcg cgg gat ttg gcc gcc gcg ggg
G A A P L S A G V R H W A P D L A A A G
61/21                               91/31
ctc cgg agc cgc tcg ctc ccg aca cgg ctc acg atg cgc ggc gac agg gcc ggc ggg ggc
L R S R S L P T R L T M R G D R A G G G
121/41                               151/51
ccc gtg ctc cag ttc act aac tgc cgg atc ctg cgc gga ggg aaa ctg ctc agg gag gat
P V L Q F T N C R I L R G G K L L R E D
181/61                               211/71
ctg tgg gtg cgc gga ggc cgc atc ttg gac cca gag aag ctg ttc ttt gag gag cgg cgc
L W V R G G R I L D P E K L F F E E R R
241/81                               271/91
gtg gcc gac gag cgg cgg gac tgc ggg ggc cgc atc ttg gct ccc gga ttc atc gac gtg
V A D E R R D C G G R I L A P G F I D V
301/101                               331/111
cag atc aac cgt gga TTT GGT GTT GAC TTC TCT CAA GCC ACG GAG GAC GTG GGT TCG GGG
Q I N R G F G V D F S Q A T E D V G S G
361/121                               391/131
GTT GCC CTC GTG GCC CGG AGG ATC CTG TCG CAC GGC GTC ACC TCC TTC TGC CCC ACC CTG
V A L V A R R I L S H G V T S F C P T L
421/141                               451/151
GTC ACT TCC CCA CCG GAG GCT TAT CAC AAG GTT GTT CCT CAG ATC CCT GTG AAG AGT GGT
V T S P P E A Y H K V V P Q I P V K S G
481/161                               511/171
GGT CCC CAT GGG GCA GGG GTC CTC GGG CTG CAC CTG GAG GGC CCC TTC ATC AGC CGG GAG
G P H G A G V L G L H L E G P F I S R E
541/181                               571/191
AAG CGG GGC GCG CAC CCC GAG GCC CAC CTC CGC TCC TTC GAG GCC GAT GCC TTC CAG GAC
K R G A H P E A H L R S F E A D A F Q D
601/201                               631/211
TTG CTG GCC ACC TAC GGG CCC CTG GAC AAT GTC CGC ATC GTG ACG CTG GCC CCA GAG TTG
L L A T Y G P L D N V R I V T L A P E L
661/221                               691/231
GGC CGT AGC CAC GAA GTG ATC CGG GCG CTG ACG GCC CGT GGC ATC TGC GTG TCC CTA GGG
G R S H E V I R A L T A R G I C V S L G
721/241                               751/251
CAC TCA GTG GCT GAC CTG CGG GCG GCA GAG GAT GCT GTG TGG AGC GGA GCC ACC TTC ATC
H S V A D L R A A E D A V W S G A T F I
781/261                               811/271
ACC CAC CTC TTC AAC GCC ATG CTG CCT TTC CAC CAC CGC GAC CCA GGC ATC GTG GGG CTC
T H L F N A M L P F H H R D P G I V G L

```

图

3

```

841/281
CTG ACC AGC GAC CGG CTG CCC GCA GGC CGC
L T S D R L P A G R
901/301
ACG CAC ACC AAC CCC GCC GCC CTG CGG ATC
T H T N P A A L R I
961/321
CTG GTC ACC GAT GCC ATC CCT GCC TTG GGC
L V T D A I P A L G
1021/341
CAG GAA GTG GAA GTG GAC GGT CTG ACG GCC
Q E V E V D G L T A
1081/361
GGT CCC AGG TCC CAG CCC GCA TGC CAG GTG
G P R S Q P A C Q V
1141/381
TGC TCT CAA GGC ACC AAG ACG CTG AGT GGC
C S Q G T K T L S G
1201/401
CAC TTC CTG CAG GCC ACA GGC TGC AGC ATG
H F L Q A T G C S M
1261/421
CCC GCC CAG TTG CTG GGG CTG GAG AAG AGT
P A Q L L G L E K S
1321/441
GAC TTC GTG GTG CTC GAC GAC TCC CTT CAC
D F V V L D D S L H
1381/461
GTG TGG CAG GCG GAC GCA GCT AGG CAG TGA
V W Q A D A A R Q *
1441/481
GCA GCG GGA TGC CAT CAG GGC CGG GTG GTT
A A G C H Q G R V V
1501/501
AGC CCT GCT GGA T
S P A G
871/291
TGC ATC TTC TAT GGG ATG ATT GCA GAT GGC
C I F Y G M I A D G
931/311
GCC CAC CGT GCC CAT CCC CAG GGG CTG GTG
A H R A H P Q G L V
991/331
CTG GGC AAC GGC CGG CAC ACG CTG GGA CAG
L G N G R H T L G Q
1051/351
TAC GTG GCA GGT GAG CGC CCT GAC CCA CTG
Y V A G E R P D P L
1111/371
GCC CAC GAC CCC CCC AGA GCC TGC CCT CTC
A H D P P R A C P L
1171/391
AGC ATA GCC CCA ATG AAC GTC TGT GTC CGG
S I A P M N V C V R
1231/411
GAG TCG GCC CTG GAG GCT GCA TCC CTG CAC
E S A L E A A S L H
1291/431
AAG GGG ACC CTG GAC TTT GGT GCT GAC GCA
K G T L D F G A D A
1351/451
GTC CAG GCC ACC TAC ATC TCG GGT GAG CTG
V Q A T Y I S G E L
1411/471
CAA GGA CCT CGG CTG AGA GGA CAC CTG GCC
Q G P R L R G H L A
1471/491
GGG GAG CTG GTC TCC AGG GAG TGA GTC GGG
G E L V S R E * V G

```

图

3(a)

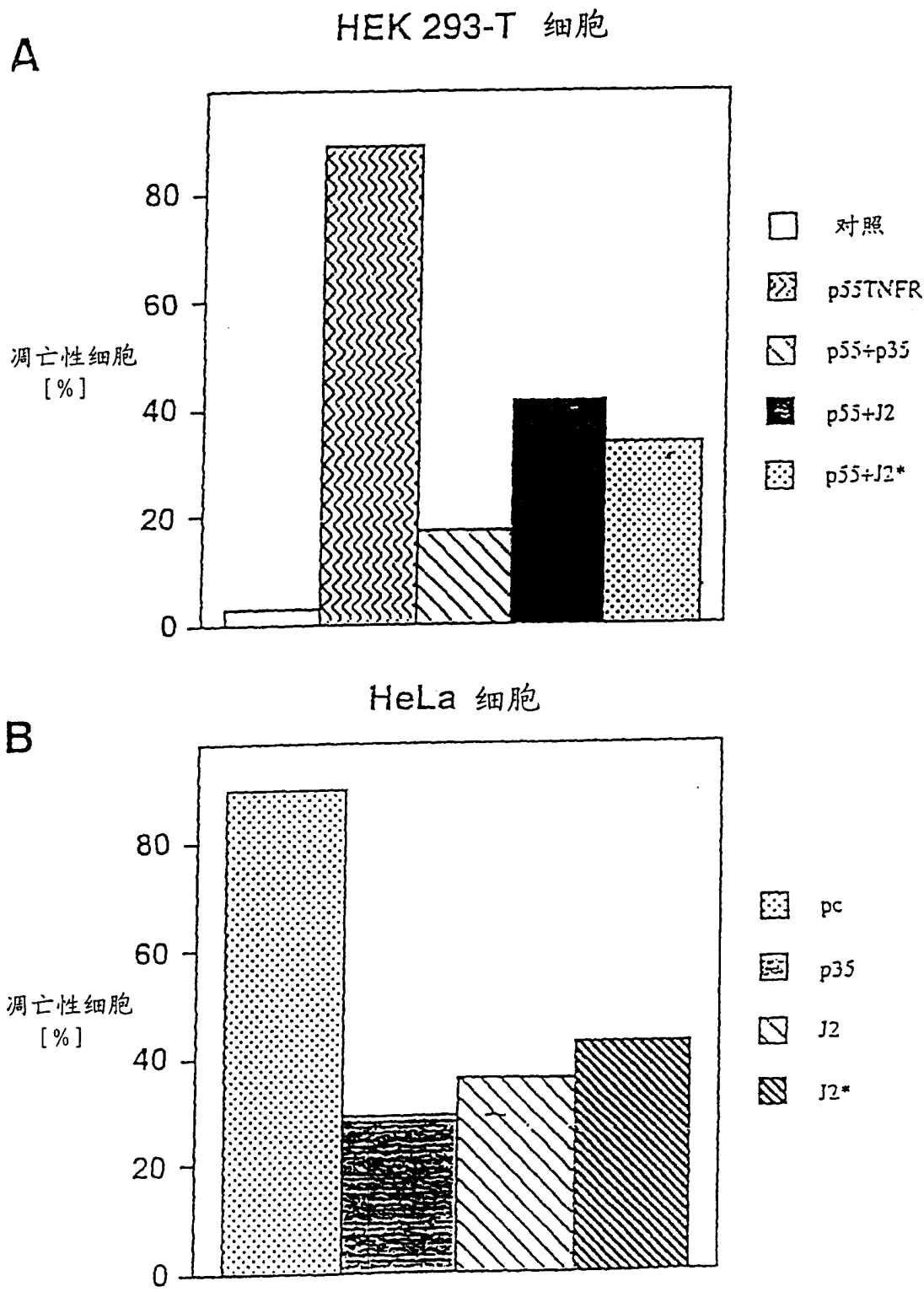


图 4

```

1 GAGCAGCTCA NNACTCACGT CCAGGTGATC AAGAGGTGAG CCAAGCCGAG TGAGAAAGCCC CGGCTGGGC AGATACCTC GGCTGAAGAC CTGGAGACAG 100
101 ATGGGGGGG ACCGGGCCAG GTGTGGACG ATGGCCTGGA GCACAGGGAG CTGGGCCATG GGCAGCCTGA GGCNAGAGC CCCGCTCCTC TCCAGCAGCA 200
201 CCTCAGGTG TTGCTCTGGG AACAGCAGG ACTGGCTGGG CGGCTCCCCC GGGGAGCAC CGGGGACACT GTGCTGCTC CTCTGGCCCA GGGTGGGCAC 300
301 CGGCTCTGT CCCGGGCTCA GTCTTCCCA ACCACAGGGC TGATCTATGA CTCGGTCATG AGCCCCAGAG CCTGCCAGC AGGCCGAGT CCTCTCCAGC TCAGAGACCC 400
401 CTGCCAGGAC CCTGCCCTTC ACCACAGGGC TGATCTATGA CTCGGTCATG CTGAAGCACC AGTGCTCCTG CGGTGACNAC AGCAGGCACC CGGAGCACGC 500
501 CGGCCGCATC CAGAGCATCT GTTCCCGGCT GGTCCCGGCT GCGGAGCGG GGGCTCCGGA GCGNGTGTGA GTGTCTCCGA GCGCGGAGG CCTCCCTGGA AGAGCTGCAG 600
601 TCGGTCCACT CTGAGCGGCA CGTGCTCCTC TACGGCACCA ACCCGCTCAG CCGCTCNAI CTGGACNAC GGNAGCTGGC AGGGCTCCTG GCACAGCGGA 700
701 TGTTTGTGAT GCTGCCCTGT GGTGGGTTG GGTGGGACAC TGACACCATC TGGMATGAGC TTCAATCCTC CAATGCAGCC CGCTGGGCCG CTGGCAGTGT 800
801 CACTGACCTC GGCTTCANAG TGGCTTCTCG TGAGCTNANAG NATGGTTTCG CTGTGGTGG GCGCCCAAGG CACCATGCAG ATCATTCAAC AGCCATGGGC 900
901 TTCTGCTTCT TCNACTCAGT GGCCATCGCC TGCCGGCAGC TGCNACAGCA GAGCANAGGC AGCANAGATCC TCATTGTAGA CTGGGACGTG CACCATGGCA 1000
1001 ACGGCACCCA GCNAACCTTC TACCNAGACC CCAGTGTGCT CTACATCTCC CTGCATCGCC ATGACGACGG CAACTTCTTC CCAGGGAGTG GGGCTGTGGA 1100
1101 TGAGGTAGGG GCTGGCAGCG GTGAGGGCTT CAATGTCAAT GTGGCCTGGG CTGAGGTCTT GGNACCCGCC ATGGGGGATC CTGAGTACCT GGCTGCTTTC 1200
1201 AGGATAGTGG TGATGCCCAT CGCCCGAGAG TTCTCTCCAG ACCTAGTCTT GGTGTCTGCT GGATTTGATG CTGCTGAGGG TCACCCGGCC CCACTGGGTG 1300
1301 GCTACCATGT TTCTGCCNAA TGTTTTGGAT ACNIGACGCA GCAACTGATG AACCTGGCAG GAGGCGCAGT GGTGCTGGCC TTGGAGGGTG GCCATGACCT 1400
1401 CACAGCCATC TGTGACGCC TGTGAGGCCCT GTGGGCTGCT CTCTGGGTA ACAGGGTGA TCCCTTTCA GAGNAGGCT GGNACAGNA ACCCAACCTC 1500
1501 AATTCCATCC GCTCTCTGGA GGCCGTGATC CGGGTGCACA GTNANATATG GGGCTGCATG CAGCGCCTGG CCTCCTGTCC AGACTCCTGG GTGCCATAGAG 1600
1601 TGCCAGGGGC TGACNANAGNA GAGTGGAGG CAGTAACCGC ACTGGCCTCC CTCTCTGTGG GCATCCTGGC TGNAGATAGG CCCTCGGAGC AGCTGGTGA 1700
1701 GGAGGAAGNA CCTATGAATC TCTNA

```

5A



	1	10	1	20	1	30	1	40	1	50	1	60	1	70	1	80	1	90	1	100
	1	EQ	LK	TH	VQ	VI	KR	SA	KP	SE	KP	RL	RI	PS	AE	DE	LE	TH	RE	100
101	RPL	SR	AA	PS	LS	SA	PE	AS	AE	SA	PE	AS	AE	SA	PE	AS	AE	SA	PE	200
201	SV	HE	RH	VLL	YG	TN	PL	SR	LK	LD	NG	KL	AG	LL	AQ	RM	EV	ML	PC	300
301	FC	FN	SV	AI	CR	LO	QQ	SK	KA	SK	LI	VD	WD	VH	NG	GT	QT	YQ	DP	400
401	RIV	VP	JA	RE	FS	DL	VL	VS	AF	GD	RA	EG	HP	PL	GG	YH	VS	AK	CF	500
501	NS	IR	SL	EA	VI	RV	HS	KY	WG	CM	QR	LA	SC	PD	SW	VP	RG	AD	KE	574

图 5B

[illegible]

6

克隆的 推导的	1 331	 E L O V G P Q E Q E L R O L L H K D K S K R S K E Y A T P A Q P S
克隆的 推导的	1 364	 P T S O V P A A C Y A C A Y A S S V Y K Q K L A E V I L K K Q Q
克隆的 推导的	1 397	 A A L E R T Y H P N S P G I P Y R S Q Q P C S Q Q C P C S Y P T P
克隆的 推导的	1 430	 L K O P W H S F C R T L E P L E T E Q A T R S M L S S F L P P Y P
克隆的 推导的	1 463	 S L P S D P P E H F P L R K T Y S E P N L K L R Y K P K S L E R
克隆的 推导的	1 496	 R K N P L L R K E S A P P S L R R R P A E T L G D S S P S S S T
克隆的 推导的	1 529	 P A S G C S S P N D S E H G P N P I L G S E A L L G Q R L R L Q E
克隆的 推导的	1 562	 T S V A P F A L P T Y S L L P A I T L Q L P A P A R A D S D R R T
克隆的 推导的	1 595	 H P T L G P R G P I L G S P H T P L F L P H G L E P E A G Q T L P
克隆的 推导的	1 628	 S R L Q P I L L L D P S G S H A P L L T Y P G L Q P L P F H F A Q

[冬]

7(a)

克隆的 推导的	1 661	 SLMTTERLSGSGLHWPLSRTSRSEPLPPSATAPP
克隆的 推导的	1 694	 PPGPMQPRLEQLKTHVOVIKRS AKPSEKPRLRO EQLKTHVOVIKRS AKPSEKPRLRO
克隆的 推导的	25 727	IPSAEDLET DGGGPGQVYDDGLEHRELGHGOPE IPSAEDLET DGGGPGQVYDDGLEHRELGHGOPE
克隆的 推导的	58 760	ARGPAPLOQHPOVLLWEQQRLAGRLPRGSTGDT ARGPAPLOQHPOVLLWEQQRLAGRLPRGSTGDT
克隆的 推导的	91 793	YLLPLAQQGHRPLSRAOSSPAAAPASLSAPEPAS YLLPLAQQGHRPLSRAOSSPAAAPASLSAPEPAS
克隆的 推导的	124 826	QARYLSSSETPARTLPFTTGLIYDSYMLKHQCS QARYLSSSETPARTLPFTTGLIYDSYMLKHQCS
克隆的 推导的	137 859	CGDNSRHPEHAGRIOSIWSRLOERGLRSQCECL CGDNSRHPEHAGRIOSIWSRLOERGLRSQCECL
克隆的 推导的	190 892	RGRKASLEELQSYHSE RHYLLYG TNPLSRLKLD RGRKASLEELQSYHSE RHYLLYG TNPLSRLKLD

图 7(b)

克隆的 推导的	223 925	NGKLAGLLAQRMFYMLPCGGYGVDT NGKLAGLLAQRMFYMLPCGGYGPLATLSAFLAS
克隆的 推导的	245 958	 LAPTYPQGLSRYSWGLKPPPGPNPKSRPAPCPW
克隆的 推导的	245 991	 GPGRGVGTTPLGPGSCYKPWMMRALTLAPQVDT VDT
克隆的 推导的	248 1024	DTIWNEHSSNAARWAAGSVTDLAFKYASRELK DTIWNEHSSNAARWAAGSVTDLAFKYASRELK
克隆的 推导的	281 1057	NGFAYVYRPPGHHADHSTAMGFCFFNSYAIACRQ NGFAYVYRPPGHHADHSTAMGFCFFNSYAIACRQ
克隆的 推导的	314 1090	LQOOSKASKILIVDWDVHHGNGTQQTFFYQDPSY LQOOSKASKILIVDWDVHHGNGTQQTFFYQDPSY
克隆的 推导的	347 1123	LYISLHRHDDGNGFFPGSGAYDEVGAGSGEGFN LYISLHRHDDGNGFFPGSGAYDEVGAGSGEGFN
克隆的 推导的	380 1156	NVAWAGGLDPPMGDPEYLAAFRIYVMPIAREFS NVAWAGGLDPPMGDPEYLAAFRIYVMPIAREFS

图 7(c)

克隆的 推导的	413 1189	PDLVLSAGFDA PDLVLSAGFDA AAEGHPAPLGGYHYS AAEGHPAPLGGYHYS AKCFGYM AKCFGYM
克隆的 推导的	446 1222	TQOLMNL TQOLMNL AGGAVYLALEGGHDLTA AGGAVYLALEGGHDLTA ICDASEACY ICDASEACY
克隆的 推导的	479 1255	AALLGNRYDPL AALLGNRYDPL SEEGWKOKPNLNS SEEGWKOKPNLNA IRSL EAVIR IRSL EAVIR
克隆的 推导的	512 1288	VHS VHS ----- KCGDGT LAELRLKDLGGTLPHRGOILGFR ----- C
克隆的 推导的	515 1321	----- QPGDLLLVWSKIPYSDPGSNGEHPYRGYPLSP ----- -----
克隆的 推导的	515 1354	----- PDGASRAYQTYAPOGK ----- KYWGCMQRLASCPCDSWYP
克隆的 推导的	533 1387	RVPGADKEEVEAYTALASLSYGILAE RVPGADKEEVEAYTALASLSYGILAE DRPSEOL DRPSEOL
克隆的 推导的	566 1420	VEEEEP VEEEEP PMNL PMNL

图 7 (d)

8

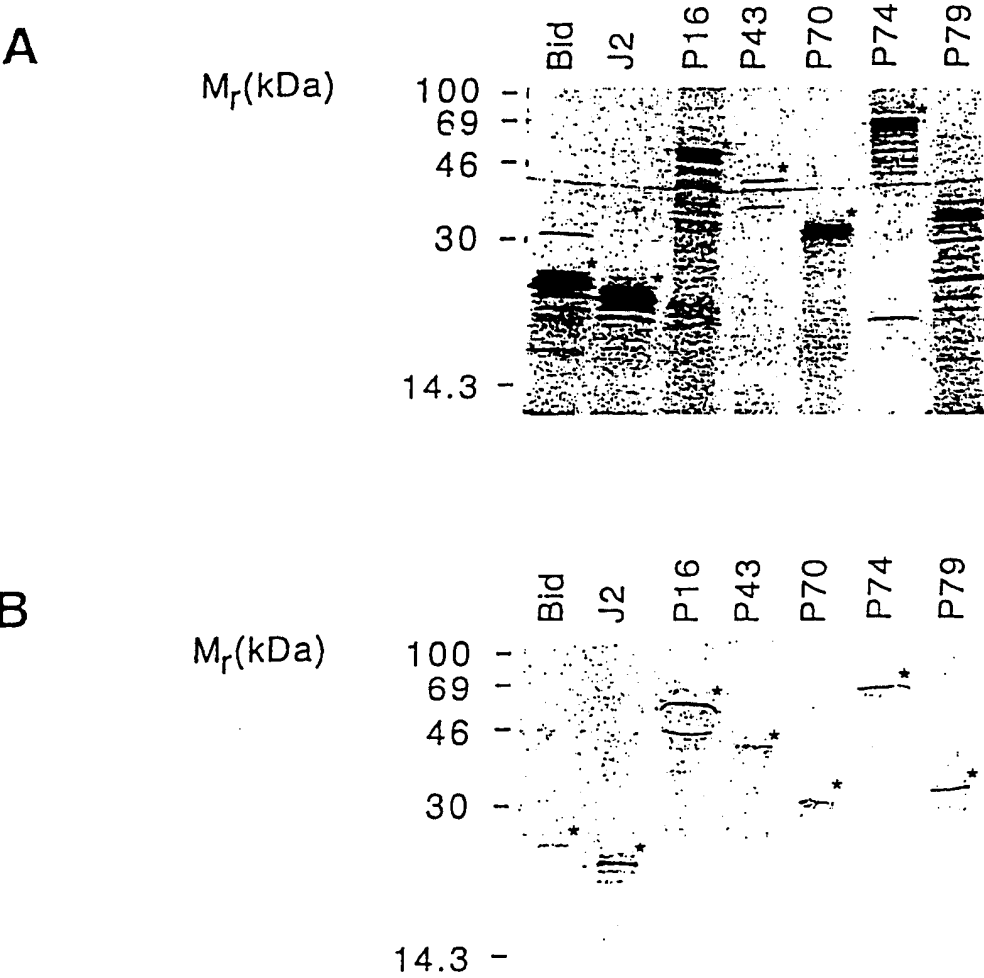


图 9

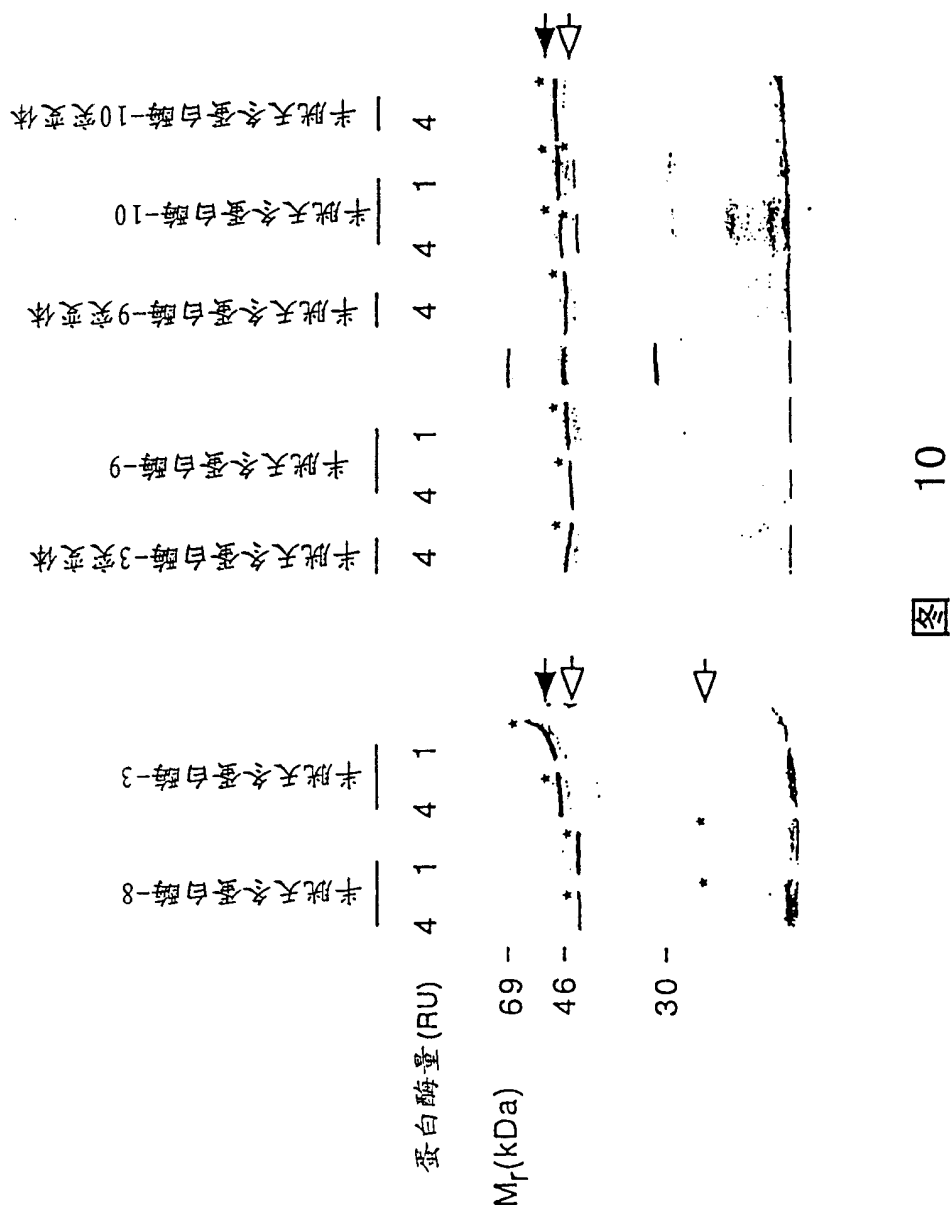


图 10

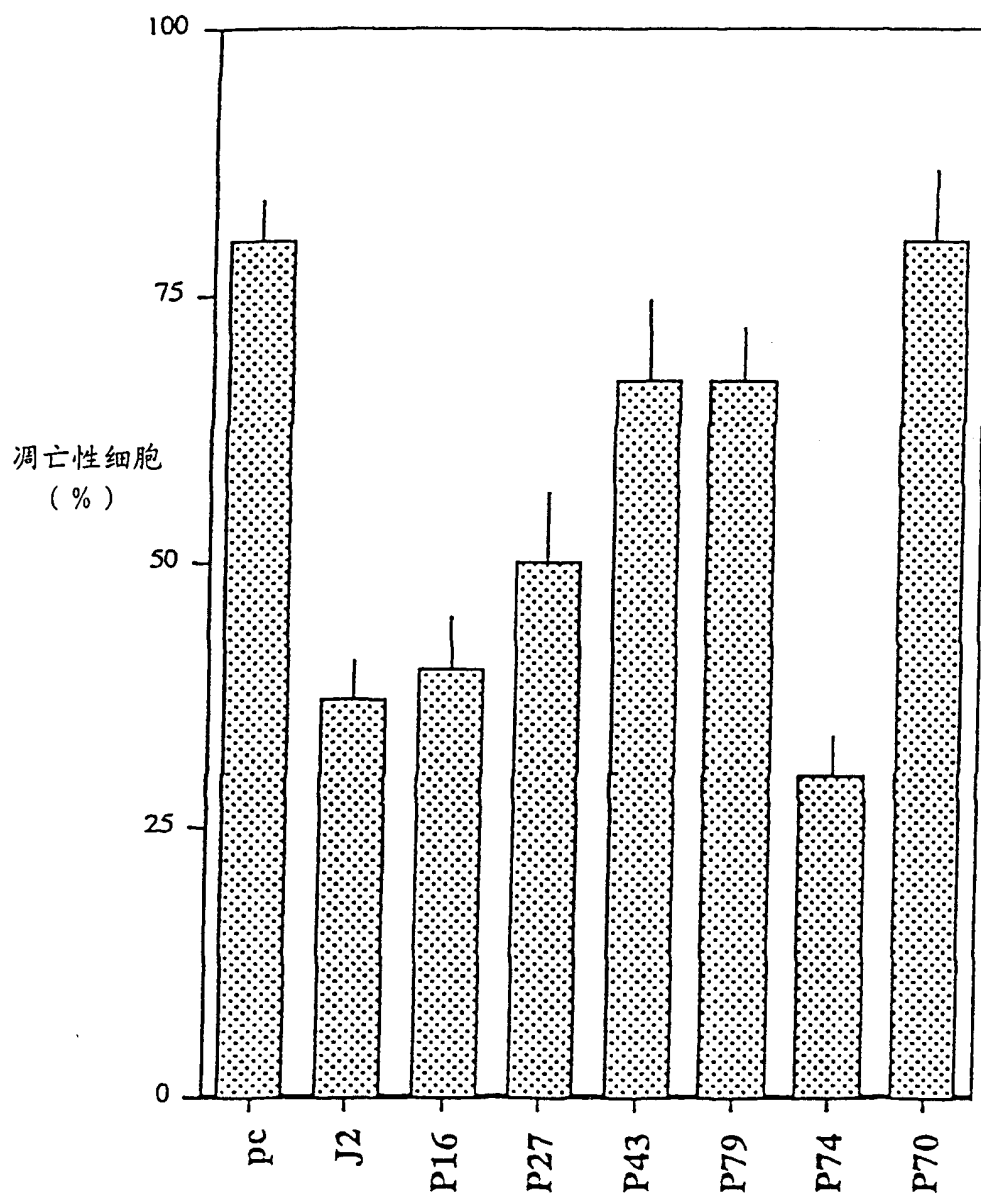


图 11

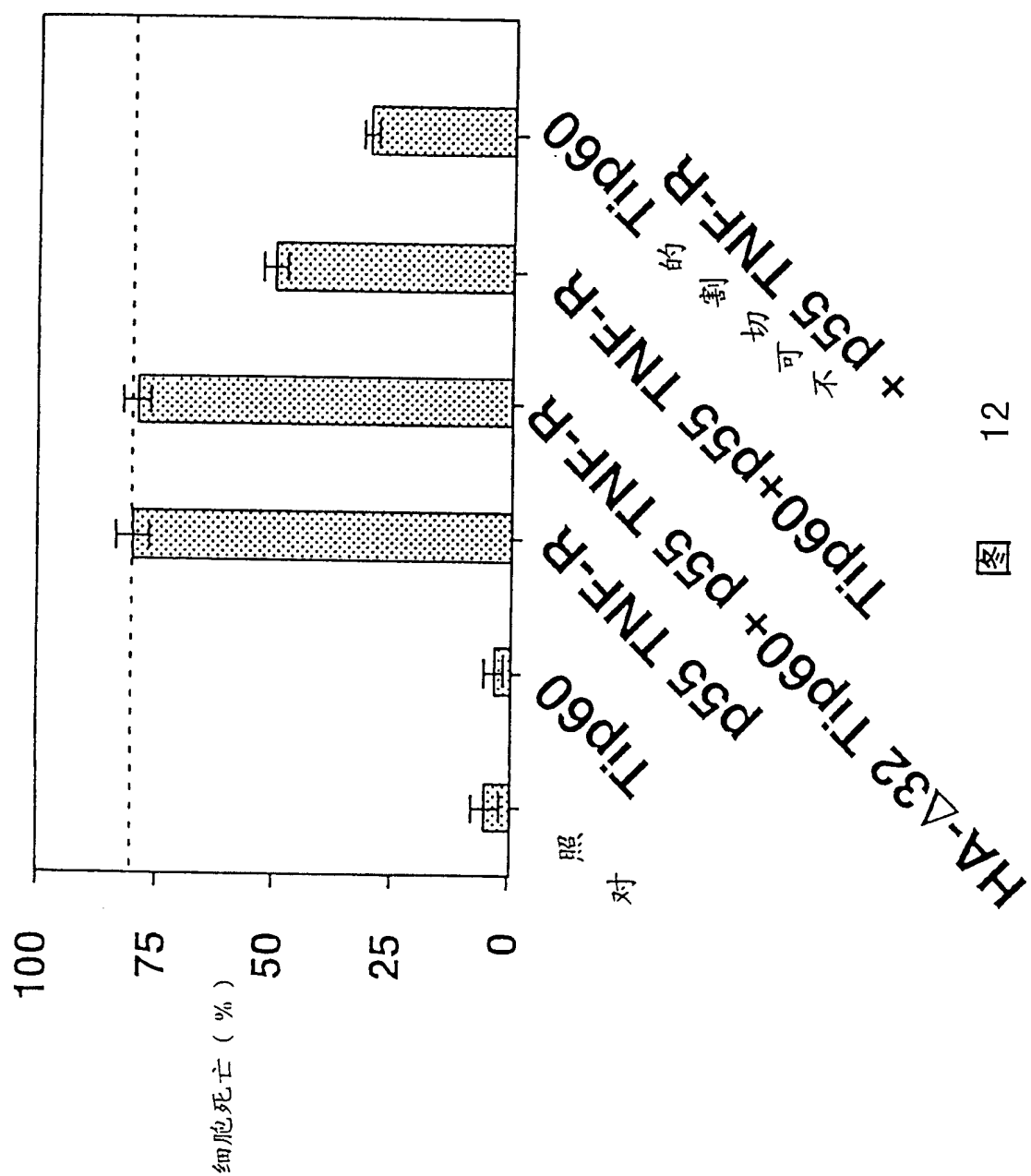


图 12