

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95192219.X

C12N 15/12
 C12N 15/54 C12N 15/55
 C07K 14/47 C12N 9/12
 C12N 9/10 C07K 1/113
 C07K 7/06 C07K 7/08
 C12Q 1/42 C12Q 1/48
 G01N 33/68

[43]公开日 1997年4月23日

[11] 公开号 CN 1148407A

[22]申请日 95.11.22

[30]优先权

[32]94.11.23 [33]US [31]08 / 344,227

[32]95.3.15 [33]US [31]08 / 404,731

[32]95.7.17 [33]US [31]08 / 503,226

[86]国际申请 PCT / US95 / 16039 95.11.22

[87]国际公布 WO96 / 16172 英 96.5.30

[85]进入国家阶段日期 96.9.23

[71]申请人 艾科斯有限公司

地址 美国华盛顿州

共同申请人 俄勒冈州政府

[72]发明人 R·O·洛卡比 V·M·科兰

M·L·霍华德 W·M·加拉丁

J·D·施科特

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 47 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 锚定蛋白功能的调节剂

[57]摘要

本发明提供了用于分离神经钙蛋白并抑制神经钙蛋白活性的组合物和方法。所述组合物是含有与 AKAP79 的神经钙蛋白结合区同源的区域的多肽。还提供了确定细胞中是否含有结合神经钙蛋白和结合 PKA 的锚定蛋白的方法。该方法有助于识别同时与神经钙蛋白和 PKA 结合的其他蛋白。另一方面,本发明也提供了增加 T 细胞的白细胞介素 2 表达的方法。

权 利 要 求 书

1. 纯化并分离的多核苷酸,其编码具有 SEQ ID NO: 33 所示序列的 pACT 59 多肽。
2. 由权利要求 1 的多核苷酸编码的 pACT 59 多肽。
- 5 3. 纯化并分离的多核苷酸,其编码具有 SEQ ID NO: 34 所示序列的 pACT 74 多肽。
4. 由权利要求 3 的多核苷酸编码的 pACT 74 多肽。
5. 纯化并分离的多核苷酸,其编码具有 SEQ ID NO: 35 所示序列的 pACT 36 多肽。
- 10 6. 由权利要求 5 的多核苷酸编码的 pACT 36 多肽。
7. 纯化并分离的多核苷酸,其编码具有 SEQ ID NO: 36 所示序列的 pACT 60 多肽。
8. 由权利要求 7 的多核苷酸编码的 pACT 36 多肽。
9. 鉴定可能的抑制剂化合物的方法,所述化合物抑制锚定蛋白和结合配对物之间的结合,所述方法包括:
 - 15 在存在和不存在可能的抑制剂化合物时,在适宜锚定蛋白和所述结合配对物结合的条件下将锚定蛋白和带标记的结合配对物保温,其中所述锚定蛋白被固定在一固体支持物上;
 - 从固体支持物上洗脱未结合的结合配对物;
 - 20 确定与固定的锚定蛋白结合的结合配对物的量;
 - 比较存在所述化合物时与锚定蛋白结合的结合配对物的量和不存在所述化合物时结合锚定蛋白的结合配对物的量; 和
 - 从中确定所述化合物是否抑制锚定蛋白和所述结合配对物间的结合。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述结合配对物是带放射性标记的。
- 25 11. 权利要求 9 的方法,其中所述结合配对物是用荧光基团标记的。
12. 权利要求 9 的方法,其中所述结合配对物是 PKA 的 I 型调节亚单位。
13. 权利要求 9 的方法,其中所述结合配对物是 PKA 的 II 型调节亚单位。
14. 权利要求 9 的方法,其中所述锚定蛋白是 AKAP 79。
15. 权利要求 9 的方法,其中所述结合配对物是神经钙蛋白多肽。
- 30 16. 权利要求 15 的方法,其中所述神经钙蛋白多肽是选自由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸 1 - 487, 1 - 400, 1 - 312, 1 - 204, 1 - 104, 332 - 487, 441 - 487, 332 - 441, 1 - 375, 1 - 354, 30 - 375, 98 - 375, 1 - 347, 1 - 340, 1 - 330, 1 - 320, 1 - 338, 1 - 336, 1 - 334, 1 - 332 和 1 - 335 组成的一组缺失突变体。
- 35 17. 选自由 SEQ ID NO: 7 的氨基酸 1 - 487, 1 - 400, 1 - 312, 1

- 204, 1 - 104, 332 - 487, 441 - 487, 332 - 441, 1 - 375, 1 - 354, 30 - 375, 98 - 375, 1 - 347, 1 - 340, 1 - 330, 1 - 320, 1 - 338, 1 - 336, 1 - 334, 1 - 332 和 1 - 335 组成的一组神经钙蛋白缺失突变体。

5 18. 提高 T 淋巴细胞表达白细胞介素 2 的方法, 包括将 T 淋巴细胞与下列氨基酸序列之一接触:

Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile 或 Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala.

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述氨基酸序列是:

10 Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile.

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述氨基酸序列被肉豆蔻酸化。

21. 权利要求 18 的方法, 其中所述氨基酸序列是: Asp-Leu-Ile-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala.

15 22. 权利要求 21 的方法, 其中所述氨基酸序列被肉豆蔻酸化。

23. 权利要求 18 的方法, 还包括用佛波醇 12 - 肉豆蔻酸酯 13 - 乙酸酯和伊屋诺霉素激活 T 细胞。

20 24. 从含有神经钙蛋白的细胞组分中分离神经钙蛋白的方法, 包括将所述细胞组分与固定在固体底物上的 AKAP 79 或其神经钙蛋白结合片段接触, 然后从中洗脱神经钙蛋白。

25. 在细胞中抑制神经钙蛋白活性的方法, 包括将所述细胞与含有下列氨基酸序列的神经钙蛋白结合肽接触:

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro.

26. 权利要求 25 的方法, 其中所述肽是

25 Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro -Leu-Gln.

27. 权利要求 25 的方法, 其中所述肽是:

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys.

28. 权利要求 25 的方法, 其中所述肽不结合 PKA.

30 29. 确定细胞是否含有结合神经钙蛋白和结合 PKA 的锚定蛋白的方法, 包括:

裂解细胞以形成裂解产物;

将裂解产物与固体支持物一起保温, 所述固体支持物上固定有神经钙蛋白分子;

从固体支持物上洗脱裂解产物;

35 将所述固体支持物与结合在锚定蛋白上的带标记的 PKA 调节亚单位接触;

从固体支持物上洗脱调节亚单位;
检测保留在固体支持物上的标记;
从中确定在细胞中是否存在结合神经钙蛋白和结合 PKA 的锚定蛋白。

说明书

锚定蛋白功能的调节剂

5 本申请是共同未决美国专利申请系列 No.08/503,226 (1995年7月17日申请的)的接续申请, 08/503,226是08/404,731(1995年3月15日申请)的接续申请, 08/404,731依次又是共同未决美国专利申请 No.08/344,227(1994年11月23日)的接续申请。

10 本发明领域

本发明主要涉及调节神经钙蛋白的磷酸酶活性和调节由T细胞所进行的白细胞介素2的表达。更具体地说,本发明涉及用特定的肽抑制神经钙蛋白的磷酸酶活性以及通过用特定的其他肽处理细胞而提高T细胞表达白细胞介素2的能力。

15 本发明背景

神经钙蛋白是Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白磷酸酶,而且是许多细胞内信号途径的参与者(Guerini and Klee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9183-9187(1989))。已从酵母到哺乳动物的真核细胞中鉴定了所述酶。(Cyert and Thorner, J. Cell. Biol. 107:841a(1989) and Klee et al., Adv. Enzymol., 61:149-200(1984))。由于神经钙蛋白在相同细胞中可以参与许多的信号途径,那么肯定存在一些神经钙蛋白活性特异性目标确定方式。一种特异性酶活性的目标确定细胞方式是分区化。分区化将信号途径分成不同的部分,从而促进对不同刺激的细胞应答的特异性。通过酶与特异性锚定蛋白的相互作用而产生特定酶的分区化。例如, cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)通过与A激酶锚定蛋白(AKAP)的结合而锚定在特定的细胞内位点。由于已经表明AKAP可与PKA以外的蛋白质结合,所以在本文中,通常将该蛋白质家族称为锚定蛋白。(Hirsch et al., J. Biol. Chem. 267:2131-2134(1992))。cAMP通过与PKA全酶的调节亚单位(R)结合而激活PKA,然后引起活性催化亚单位(C)的释放。存在两类R亚单位:分别形成I型和II型PKA全酶的RI和RII。这些PKA异构体的亚细胞分布看起来是不同的。据报道RI异构体(RI α 和RI β)明显属于胞质的,而且被排除在核区外,而高达75%的RII异构体(RII α 或RII β)是颗粒状的,而且与质膜、细胞骨架组分、分泌性颗粒、高尔基体、中心体,也可能与核有联系。

已经在许多器官中鉴定了锚定蛋白。已经鉴定了至少七种与加州海兔(一种海洋无脊椎动物)中的PKA调节亚单位结合的蛋白(Cheley et al., J. Biol.

Chem., 269:2911-2920(1994))。这些蛋白质之一被富集在粗膜组分和紫杉酚固定的微管中,而且可以由此将微管锚定到细胞膜上并结合 PKA。已经鉴定的一种哺乳动物锚定蛋白就是与微管有关的;微管相关蛋白 2 (MAP2) 将 PKA 附着到细胞骨架上 (Threurkauf and Vallee, J. Biol. Chem., 257:3284-3290(1982) and DeCamilli et al., J. Cell Biol., 103:189-203(1986))。在 MAP2 上的 PKA 结合位点是位于该分子氨基末端区域的 31 个残基的肽 (Rubino et al., Neuron, 3:631-638(1989) and Obar et al., Neuron, 3:639-645(1989))。

与微管有关的另一锚定蛋白, AKAP 150, 积累在与微管紧密相关的树突中 (Glantz et al., Mol. Biol. Cell, 3:1215-1228(1992))。AKAP 150 位于数种神经元细胞中,而且是该锚定蛋白家族是锚定蛋白家族的成员哺乳动物脑中主要锚定蛋白质的。该家族的其他成员包括在牛脑中发现的 AKAP 75 和在人脑中发现的 AKAP 79 (Glantz et al., J. Biol. Chem., 268:12796-12804(1993))。AKAP 75 通过两个靠近 AKAP 75 N 末端的不连续区而与细胞骨架元件结合。AKAP 79 明显存在于人前脑突触后密质 (PSDs) 中 (Carr et al., J. Biol. Chem., 267:16816-16823(1992))。

也已被其他锚定蛋白表征了。已经表明粒层细胞暴露于滤泡刺激激素和雌二醇可以提高 80 kDa AKAP 的表达 (Carr et al., J. Biol. Chem., 268:20729 - 20732(1993))。已经从人甲状腺 cDNA 文库中克隆了另一 AKAP, Ht31 (Carr et al., J. Biol. Chem., 267:13376 - 13382(1992))。另一锚定蛋白 AKAP 95 在细胞周期中改变其细胞内位置。AKAP 95 是分裂间期的完整核蛋白,但在有丝分裂期间,当核膜分裂时, AKAP95 与胞质 PKA 有关。这表明在与细胞周期相关的 cAMP 应答事件中, AKAP95 在以 PKA 特定异构体的活性为靶的过程中起作用 (Coghlan et al., J. Biol. Chem., 269:7658-7665(1994))。其他已知的锚定蛋白包括将 PKA 与高尔基体相连的 85 kDa AKAP (Roiss et al., EMBO J., 11:1723-1731(1992)) 和将 PKA 与中心体结合的 350 kDa AKAP (Keryer et al., Exp. Cell Res., 204:230-240(1993))。

已知的锚定蛋白通过一种普通的机制结合 PKA。尽管锚定蛋白的一级结构不是保守的,但是都有包括一个两亲的螺旋区的二级结构基元 (Scott and McCartney, Mol. Endo., 8:5-11(1994))。模拟锚定蛋白 PKA 结合区螺旋结构的肽可以阻断锚定蛋白与 PKA 调节亚单位的结合。通过氨基酸取代破坏所述肽的螺旋结构会破坏其对 PKA - 锚定蛋白结合的阻断作用 (Carr et al., J. Biol. Chem., 266:14188-14192(1991)), 这表明 PKA 结合发生在锚定蛋白的两亲螺旋区,而且由锚定蛋白分子二级结构控制。PKA 通过锚定蛋白的细胞内结合和定位为分离象神经钙蛋白这类激酶提供了方法,所述激酶在可能以途径特异性方式起作用的许多信号途径中是共通的。

PKA 在许多细胞内途径中起作用。例如,在海马神经元中 AKAP79 和 PKA

之间结合的抑制已表明是抑制 α - 氨基 - 3 羟基 - 5 - 甲基 - 4 - 异噁唑 - 丙酸/卡英酸 谷氨酸盐受体。 (Rosenmund et al., Nature ,368:853-856(1994))。这表
明 PKA 调节这些受体。通过可逆地磷酸化糖原磷酸化酶以应答激素诱导的细胞内 cAMP 的增加, PKA 还可调节糖原磷酸化酶的活性 (Walsh et al., J. Biol.Chem ., 243:3763-3765(1969))。已表明 cAMP 还抑制通过 MAP 激酶途径传递信号 (Wu et al., Science,262:1065-1072(1993))。通过激活抑制经 Ras 的 Raf - 1 活化作用的 PKA, 可以阻断 MAP 激酶途径, 从而介导上述抑制作用 (Vojtek et al., Cell, 74:205-214(1993) and Hafner et al., Mol.Cell Biol.,14:6696-6703(1994))。这些途径在许多细胞类型中是重要的, 而且意味着许多细胞功能, 例如白细胞介素 2 基因的转录激活在 T 细胞活化中是重要的 (Weiss and Littman , Cell, 76:263-274(1994);Owaki et al., EMBO J.,12:4367-4373(1993))。

象 PKA 一样, 神经钙蛋白与 T 细胞活化有关 (Clipstone and Crabtree,Nature ,357:695-697(1992);O'Keefe et al., Nature ,357:692-694(1992))。在 T 细胞中, 神经钙蛋白参与 T 细胞受激后 IL - 2 表达的调节 (Weiss and Littman ,同上文)。已经表明活化 T 细胞的核因子 (NFAT_p) 是神经钙蛋白磷酸酶活性的底物。已经表明在 T 细胞激后, 神经钙蛋白介导的 NFAT_p 去磷酸化使得 NFAT_p 从胞质易位到核, 在那里 NFAT_p 与 Fos 和 Jun 相互作用诱导 IL - 2 基因的表达 (Jain et al., Nature, 365:352-355(1993))。

神经钙蛋白在 T 细胞激活中的作用提供了治疗上和药物的对象, 用来治疗已证明抑制神经钙蛋白的 T 细胞介导的失调。已在临床中使用了两种神经钙蛋白抑制药物, 环孢菌素 A(环孢菌素 cyclosporin)和 FK506 (Thomson and Starzl. Immunol. Rev., 136:71-98(1993))。只有在与称为 免疫亲和蛋白 (cyclophilin and FKBP 12,分别) 的不同细胞内蛋白质结合后, 环孢菌素和 FK506 才会抑制神经钙蛋白 (Schreiber and Crabtree ,Immunology Today ,13:136-142(1992))。因此, 环孢菌素和 FK506 起前药作用。在与其相应的免疫亲和蛋白结合后, 药物/免疫亲和蛋白复合物结合神经钙蛋白, 由此抑制磷酸酶活性。

在器官移植后的移植排异治疗中, 已经最有效地使用了神经钙蛋白抑制作用。已经在肾、肝、心、肺和骨髓移植中使用了环孢菌素和 FK506。加拿大多中心移植研究组, N.Engl. J. Med., 314:1219-1225(1986);Oyer et al. ,Transplant Proc. 15:Suppl 1:2546-2552(1983);Starzl et al., N.Engl. J. Med., 305:266-269(1981);多伦多肺移植组, JAMA , 259: 2258 - 2262 (1988);和 Deeg et al., Blood , 65:1325-1334(1985)。在移植后, 这些药物的使用显著地延长了移植存活并降低了发病率 (Najarian et al., Ann. Surg., 201:142-157(1985) and Showstack et al., N.Engl. J.Med.,321:1086-1092(1989))。

还在各种自体免疫相关的疾病中使用了环孢菌素。眼色素层炎在治疗后几周内得到改善，但在不连续使用环孢菌素后很快复发（Nussenblatt et al., *Am J.Ophthalmol.*, 96:275-282(1983)）相似地，用环孢菌素治疗，牛皮癣通常得到改善，但在治疗后，很快复发（Ellis et al., *JAMA*,256:3110-3116(1986)）。
5 当在两个月的胰岛素治疗中施用环孢菌素，在 I 型和 II 型糖尿病初期，可以诱发并延长胰岛素非依赖的“蜜月”期（Feutren et al., *Lancet*,2:119-124(1986) and Bougneres et al., *N.Engl. J.Med.*, 318:663-670(1988)）。各种肾病，包括 minimal-change focal 和 segmental，膜性和 IgA 介导的肾病对环孢菌素也是敏感的，尽管观察到的蛋白尿降低可能是由于肾小球过滤速率的降低而不是
10 基膜的愈合引起的。（Tejani et al.,*Kidney Intl.*,29:206(1986)）。环孢菌素的施用对类风湿性关节炎还有剂量依赖作用，尽管这种施用与高发生率的肾中毒有关（F O rre et al., *Anthritis Rheum.*, 30:88-92(1987)）。

正如上面提到的，环孢菌素与肾中毒有关（Mason ,*Pharmacol.Rev.*,42:423-434(1989)）。实际上所有用环孢菌素治疗的
15 患者都会发生肾功能降低（Kahan,*N.Engl.J.Med.*,321:1725-1738(1989)）。但在终止环孢菌素治疗后这种情况一般可以得到回复。不幸的是，在器官移植受体中，其他常用的免疫抑制剂代替环孢菌素会带来高移植排异风险。在肾移植患者中，这可以用透析来得到控制。在已经接受了心、肺或肝移植的患者中，移植排异可能是致命的。尽管通常比肾中毒的发生率低，但神经中毒
20 性和肝毒害性还是与环孢菌素治疗有关（de Groen et al., *N.Engl.J.Med.*, 317:861-866(1987) and Kahan et al., *Transplantation*,43:197-204(1987)）。

在施用 FK506 时，毒性也变得明显。象环孢菌素一样，FK506 也与肾中毒有关（Peters et al., *Drugs*, 4:746-794(1993)）。临床表现，损伤形态和发生率均与环孢菌素的相似（McCauley,*Curr.Op.Nephrol.Hyperten.*, 2:662-
25 669(1993)）。神经毒性也与 FK506 有关（Eidelman et al., *Transplant .Proc.*,23:3175-3178(1991) and Fung et al., *Transplant.Proc.*,23:3105-3108(1991)）。与环孢菌素相反，FK506 有亲肝作用而不是肝毒害作用（Peters et al., 同上文）。

从免疫抑制剂，例如环孢菌素和 FK506 的显著潜在毒性可以清楚地看出，本领域需要其他抑制神经钙蛋白的试剂。这些试剂最好具有比现有的试剂更低的副作用，并因此可以改进免疫抑制剂治疗。另外，还需要在 T 细胞中抑制 PKA 的试剂，以便提高所述细胞表达白细胞介素 2 的水平。

发明综述

本发明部分基于神经钙蛋白结合 AKAP 79 的发现。通过结合 PKA 和神经钙蛋白，AKAP 79 共定位可以通过特定信号途径调节的激酶和磷酸酶。由此，本发明提供了分离神经钙蛋白以及抑制细胞中神经钙蛋白活性的组合
35

物和方法。所述分离方法包括将细胞组分与固定在固体底物上的 AKAP 79 或其神经钙蛋白结合片段接触，然后从中洗脱神经钙蛋白。神经钙蛋白抑制方法包括将细胞与 AKAP79 或其神经钙蛋白结合片段接触。优选地，神经钙蛋白结合的肽不与 PKA 结合。优选的肽含有下列氨基酸序列：

5 Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro (SEQ ID NO : 1)

在本发明神经钙蛋白抑制方法中可选的肽包括：

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu-Gln (SEQ ID NO : 2)

10 和

Arg-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Ser-Ser-Lys-Glu-Glu-Lys-Pro-Phe-Lys (SEQ ID NO : 3)

这些肽与结合神经钙蛋白的 AKAP79 的氨基酸序列同源。尽管这些肽与 FKBP12 的神经钙蛋白结合区相似，但是与 FK506/FKBP12 复合物的神经钙蛋白抑制作用不同，这些肽不需要与另一分子作用就可以抑制神经钙蛋白。

15 可以对这些肽进行修饰，例如与脂溶性部分结合，以便于进入细胞。例如，这些肽可以与肉豆蔻酸结合。另外，可以将这些肽包装在可以与细胞膜融合并将所述肽释放到细胞中的脂质体中。

本发明的另一方面是确定细胞是否含有神经钙蛋白结合及 PKA 结合锚定蛋白的方法。所述方法通常包括裂解细胞以形成裂解产物；将裂解产物与固体支持物保温，所述固体支持物含有固定于其上的神经钙蛋白分子；从固体支持物上洗脱裂解产物；将所述固体支持物与标记的 PKA 调节亚单位接触，从固体支持物上洗掉未结合的调节亚单位；检测保留在固体支持物上的标记；由此确定在细胞中是否存在神经钙蛋白结合的和 PKA 结合的锚定蛋白。

20 另外，可以将 PKA 调节亚单位固定在固体支持物上，神经钙蛋白可以作为标记的分子。通常，PKA 调节亚单位是 RII 亚单位。

这些方法对于鉴定与 PKA 和神经钙蛋白二者都结合的其它蛋白质也是有用的。其它所述蛋白质的鉴定为治疗提供了组织特异性靶。

本发明还包括鉴定调节神经钙蛋白和神经钙蛋白锚定蛋白之间结合化合物的方法。神经钙蛋白或锚定蛋白可以与固体底物结合。用可检测标记方法标记未结合的配对物。在存在待测化合物的条件下，保温结合的配对物。通过观察与固定的结合配对物相结合的标记物的量来确定待测化合物对神经钙蛋白和神经钙蛋白锚定蛋白质之间结合的作用。存在待测化合物时结合的标记量比没有待测化合物时结合的标记量减少，说明了待测化合物是神经钙蛋白和神经钙蛋白锚定蛋白之间结合的抑制剂。其它的检测方法也可能被采用，例如闪烁近似检测法。

30

35

本发明的另一方面还包括提高 T 细胞白细胞介素 2 表达水平的方法。T 细胞中 PKA 激酶活性的抑制或 PKA 的定位提高了在调节白细胞介素 2 基因转录的启动子元件的控制下蛋白质的表达。这些方法通常包括将 T 淋巴细胞与下列氨基酸序列之一接触：

5 Gly-Arg-Arg-Asn-Ala-Ile-His-Asp-Ile (SEQ ID NO:5) 或
Asp-Leu-Ile-Glu- Glu-Ala-Ala-Ser -Arg-Ile-Val-Asp-Ala-Val-Ile-Glu-Gln-Val-
Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Tyr (SEQ ID NO: 9) 。

10 SEQ ID NO:5 的肽是抑制 PKA 激酶活性的肽。SEQ ID NO: 9 的肽是与 HT31 锚定蛋白的 PKA 结合区同源的肽。可以将这些肽进行修饰以便于进入细胞或如上所述包装到脂质体中。本发明设想了使用这些肽的方法的多种用途。例如，可以用所述方法刺激免疫反应，刺激用于选择性克隆扩展的活化的 T 细胞或提高 T 细胞对试验性刺激的反应以评价 T 细胞生物学中的早期过程和免疫反应的激活。

附图的简要说明

15 图 1A - 1B 说明全序列 AKAP79 和 AKAP79 的神经钙蛋白结合片段对神经钙蛋白磷酸酶活性的抑制作用。

图 2A - 2C 说明 II 型 PKA 和神经钙蛋白的亚细胞定位以及 II 型 PKA 和神经钙蛋白的共定位。

图 3 说明克隆 11.1 和人神经钙蛋白异构体 11.1 之间的同源性。

20 图 4 说明用二萜衍生物和 IBMX 处理 Jurkat 细胞诱导的细胞内 cAMP 浓度的增加。

图 5A - 5H 是说明 PKA 抑制作用和离位作用对由白细胞介素 2 启动子控制的蛋白质转录的作用的 FACS 图。

发明的详细描述

25 按照 Stewart 和 Young (Solid Phase Peptide Synthesis ,2nd ed., Pierce Chemical Company, (1984)) 或 Tam 等人 (J.Am.Chem.Soc., 105:6442(1983)) (两篇文献均引入本文作为参考) 描述的常规技术，在溶液或固体支持物上，可以合成本发明方法中所用的肽。用 Eicholtz 等人 (J.Biol.Chem., 268:1982-1986(1993)) (该文献引入本文作为参考) 描述的标准技术可以将所述肽肉豆蔻酸化。按美国专利 4, 766, 046; 5, 169, 637; 5, 180, 713; 5, 185, 154; 5, 204, 112 和 5, 252, 263 和 PCT 专利申请 92/02244 (上述文献引入本文作为参考) 中描述的标准技术将所述肽包被在脂质体中。

35 下列实施例是为了说明而不是限制本发明。实施例 1 描述了神经钙蛋白与 AKAP79 和 PKA 的关系。实施例 2 涉及用来自 AKAP79 氨基酸序列的肽抑制神经钙蛋白活性。实施例 3 说明了 II 型 PKA 和神经钙蛋白的亚细胞分布。

实施例 4 描述了说明 AKAP79 和神经钙蛋白之间生理结合的双杂交试验。实施例 5 论述了对 AKAP79 和神经钙蛋白的分析。实施例 6 描述了用神经钙蛋白突变体定义 AKAP79 结合位点。实施例 7 涉及 AKAP79 和 PKA RI 亚单位之间的相互作用。实施例 8 描述了筛选 PKA 分区化抑制剂的方法。实施例 9 描述了锚定蛋白在 IL - 2 表达调节中的作用。实施例 10 涉及其他 AKAP79 结合蛋白的鉴定。实施例 11 描述了 AKAP79 和 PKC 之间的相互作用。实施例 12 涉及锚定蛋白潜在的治疗应用。

实施例 1

本实施例说明了神经钙蛋白与 AKAP79 和 PKA 的天然关系。因此，AKAP79 的功能是共定位普遍存在的激酶和普遍存在的磷酸酶。这种共定位通过酶的磷酸化或去磷酸化而提供了酶在信号途径中的特异性调节。

用 Harlowe 和 Lane (Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Press, Cold Spring Harbor ,NY(1988)) 描述的 CaN A 或 CaN B 特异性的亲和纯化的抗体可以从钙调蛋白琼脂糖纯化的牛脑提取物中得到神经钙蛋白 (CaN) 的免疫沉淀, 最后使用缓冲液 A (10 mM HEPES pH7.9, 1.5 mM MgCl, 10 mM KCl, 1 mM PMSF 和 10 μ M IBMX) + 0.4M NaCl 的洗涤除外。在用 0.1 mM cAMP 洗脱免疫沉淀后, 按 Scott 等人所述的方法 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:4379-4383(1985)) 测量 PKA 活性。加入 0.1 mM 32 P-ATP (1.5 \times 10⁵cpm /nmol) 引发免疫沉淀的蛋白质的磷酸化, 30 $^{\circ}$ C 下 30 分钟后, 加入 SDS 加样缓冲液来终止反应, 然后进行 SDS - PAGE。按 Coghlan 等人 (J. Biol.Chem.,269:7658-7665(1994)) (引入本文作为参考) 描述的方法, 用 cAMP 琼脂糖从脑提取物的 30 - 60 % (NH₄)₂SO₄ 级分中纯化 PKA R 亚单位, 用 0.5mM Ht31 肽 (SEQ ID NO: 4) 洗脱蛋白质这一步外。按 Coghlan 等人所述方法 (同上文) 完成 Western 印迹和 PKA RII 涂覆 (overlay)。

在钙调蛋白纯化的提取物中检测激酶活性, 所述提取物在 CaN 免疫沉淀中被富集 123 \pm 3.6 倍 (\pm 标准偏差; n=3), 其激酶活性被抑制 PKA 激酶活性的肽, PKI 肽 (SEQ ID NO: 5) 特异性地抑制, 表明 PKA 的催化 (C) 亚单位是所分离的复合物的成分。AKAP 79 (AKAP75) 和 RII 的牛同源物均是 C 亚单位的底物, 而且也存在于免疫沉淀中并在加入 cAMP 和 32 P - ATP 后被磷酸化。在互补实验中, 在 cAMP 琼脂糖上用亲和层析, 从牛脑的粗提取物中分离 PKA 的 R 亚单位。用 Ht31 肽处理亲和柱, 特异性地从 cAMP 结合的 RII 中洗脱 AKAP75, 同时释放 CaN A 和 B 亚单位。在 Western 印迹中检测的裂解产物中所有 CaN 的约 5 % 与一样 AKAP75 和 RII 有关。综上所述, 这些结果表明 PKA 和 CaN 均与锚定蛋白质有关。

实施例 2

本实施例表明来自 AKAP79 的肽对神经钙蛋白磷酸酶活性的抑制作用。

为了确定 AKAP79 肽结合是否是抑制性的，在存在重组 AKAP79 的条件下检测神经钙蛋白 (CaN) 活性。简而言之，按 Carr 等人 (J. Biol. Chem., 267:16816-16823(1992)) 所述 (引入本文作为参考) 在大肠杆菌中表达重组 AKAP 79。按 Perrino 等人 (J. Biol. Chem., 267: 15965 - 15969(1992)) 所述 (引入本文作为参考) 在 Sf9 细胞中表达 CaN 和组成型活性截断突变体 CaN₄₂₀ (一种截断的, CaN 的 Ca²⁺/钙调蛋白非依赖性的组成型活性形式 (Perrino et al., J. Biol. Chem.), 在印刷中), 然后在钙调蛋白琼脂糖上纯化。按 Perrino 等人所述 (同上文) 测量对 ³²P RII 肽底物的磷酸酶活性。在图 1B 中注明的浓度范围内, 将 CaN (30 nM) 和钙调蛋白 (100 nM) 和 ³²P RII 肽 (22 μM) 与 AKAP79 蛋白和 AKAP79 肽 (SEQ ID NO: 1 - 氨基酸 81 - 102) 一起保温。从 CaN₄₂₀ 检测中略去钙调蛋白。通过闪烁计数, 在三个独立的试验中在各三份样品中测量从底物中释放的 ³²P。通过数据的线性回归分析确定重组 AKAP 79 对 CaN 的抑制常数 (K_i)。用固定在 K_m (42 μM) 的底物浓度, 通过确定 IC₅₀ 来测定 AKAP79 的 K_i 值。

图 1A 表明就磷酸化的 RII 肽底物而言, 在非竞争性方式中全序列 CaN (Ca²⁺/钙调蛋白依赖的) (圆圈) 和 CaN₄₂₀ (方块) 的 AKAP79 抑制的 Lineweaver-Burk 图。空心符号表示在没有 AKAP79 条件下的磷酸酶活性, 实心符号表示存在 AKAP79 时的磷酸酶活性。对应于 AKAP79 肽的合成肽抑制全序列 CaN (实心圆圈) 和 CaN₄₂₀, 而 Ht31 肽不是 CaN 的抑制剂 (图 1B)。观察到的抑制作用是神经钙蛋白特异性的: 对肽浓度高达 0.4 mM 时, AKAP79 肽并不显著地影响蛋白磷酸酶 1 (空心菱形) 或 2A (叉) 的活性。尽管在 AKAP 79 和 FKBP - 12 上的 CaN 结合位点相似, 但它们可能在功能上差异显著: FK506 (2 μM) 不影响抑制效力, 而重组 AKAP79 没有表现出对荧光性肽底物的肽基脯氨酰基异构酶活性。此外, FK506/FKBP 与 CaN A 亚单位相互作用所需的 CaN B 亚单位对于 AKAP79 与 CaN A 亚单位相互作用来说, 并不是必需的。而且 FK506/FKBP 与 CaN A 相互作用是钙/钙调蛋白依赖性的, 而 AKAP79 对神经钙蛋白活性的抑制作用是钙/钙调蛋白非依赖性的。总之, 这些发现表明非活性状态的 CaN 由 AKAP79 以与结合了锚定蛋白的 PKA 相类似的方式定位。

实施例 3

本实施例说明在各种组织中 II 型 PKA 和神经钙蛋白的亚细胞分布。

通过与目标亚单位的关系来限定许多蛋白激酶和蛋白质磷酸酶的亚细胞位置。由于 AKAP79 在定位 PKA 和 CaN 中的双重功能, 所以它是这类调节蛋白的一个新成员。

培养细胞, 用福尔马林固定, 按 Rosenmund 等人 (Nature ,368:853-

856(1994)) 所述将其免疫染色。用结合 FITC 的抗山羊二级抗血清进行 RII 染色。在 CaN 的染色中, 使用生物素化的抗兔二级抗血清和链霉抗生物素蛋白 - Texas - Red(Jackson)。用带有尼康 optiphot 2 显微镜的 Biorad MRC-600 共焦点激光扫描系统 (A1 和 A2 过滤仪) 得到图像, 所述显微镜备有 60x
5 planaplo 彩色 (1.6 NA) 浸没透镜。共焦点切片的绝对厚度在 1.5-2 μ m 之间。

在牛、猪、兔和鼠脑中观察到 AKAP79 同源物。这表明 PKA 和 CaN 的共定位可能是使神经元适应特异性信号传导过程的一种普遍现象。用免疫细胞化学方法, 在培养的海马神经元中研究 II 型 PKA 和 CaN 的亚细胞分布。
10 RII (图 2A 中绿标记) 和 CaN (图 2B 中的红标记) 的染色图是区域分布的, 而且在轴突处重叠 (在图 2C 中, RII 是红的, CaN 是绿的)。这些发现与通过锚定蛋白质的 II 型 PKA 和 CaN 的共定位一致, 而且表明在调节突触传递中对三元复合物的作用。这与试验表明的 RII 和 AKAP79 在这些细胞中的共定位相一致, 而且通过研究表明 AKAP79, II 型 PKA 和 CaN 是突触后密
15 质的组分。定位的三元传导复合物的潜在底物可能包括受锚定蛋白定靶的 PKA 调节的 AMPA/kainate 受体。

实施例 4

本实施例说明在酵母双杂交试验中 AKAP79 和神经钙蛋白之间的相互作用。用 AKAP79 为“饵”, 发现由来自鼠 T 细胞文库的 cDNA 编码的神经钙
20 蛋白与 AKAP79 结合。

基本按 Durfee 等人 (Gene and Development 7:555-567(1993)) 所述 (该文献引入本文作为参考) 完成所述试验。“靶”和“饵”是两个质粒, 分别含有部分 Gal - 4 转录因子。“饵”质粒 (pAS1) 是一个两微米的质粒, 带有与 Gal - 4 DNA 结合亚单位 (Keegan et al., Science, 231:699-704(1986)描述
25 的氨基酸 1 - 147, 引入本文作为参考) 相连的 ADH 启动子, 其后接有血细胞凝集素 (hemagglutinin) (HA) 片段, 多克隆位点和 ADH 终止子。用 SC - Trp 培养基保持选择。“靶”构建体是 leu2, 2 微米的质粒, 含有携带 Gal - 4 转录活化区 II (Ma and Ptashne, Cell, 48:847-853(1987)中所述氨基酸 768 - 881, 引入本文作为参考) 的 ADH 启动子和终止子, 其后接有多克隆位点。
30 在构建小鼠 T 细胞 cDNA 融合文库时使用载体 pACT。在筛选中使用的啤酒酵母 y190 的基因组中整合了两个报告基因。所述报告基因位于含有 Gal - 4 结合位点的 Gal - 1 启动子的控制下。如果由饵质粒和靶质粒编码的蛋白质相连, 则同时带有 Gal - 4 转录因子的亚单位连在了一起, 并使其起到起始报告基因转录的作用。

35 从 pET11d 主链中分离含有 AKAP79 编码区的 1.3kb NcoI/BamHI 片段, 然后与 pAS1 相连以作为用于筛选的“饵”。用标准的乙酸锂 - PEG 转化方

法, 将 1 μ g 该构建体转化 y190 MAT α 和 y190 MAT α 中。检测每种接合型 (y190A pAS1 AKAP 79 1-4 和 y190 α pAS1 AKAP 79 1-4) 中的四个分离物与含有 PKA 调节亚单位 (RII 氨基酸 1 - 89) 的融合构建体 pACT-RII 相互作用的能力。于 30 $^{\circ}$ C 在 YEPD (1 % Bacto - 酵母提取物, 2 % Bacto - 胨, 2 % 右旋糖和 2 % Bacto 琼脂) 上过夜接合菌株来完成, 然后在 SC - Leu-Trp 平皿上筛选二倍体。根据半乳糖苷酶活性来检测作为报告基因的 E.coli lac Z 基因。将接合的菌株复制到已经用 Hybond -N(Amersham) 滤纸覆盖了的 SC - Leu-Trp 平皿上, 然后过夜生长。将滤纸在液氮中放 1 分钟以使酵母裂解。用在 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl 和 10 mM MgSO₄ 中的约 3ml 0.1 % X - gal 饱和 3 MM 纸圆片。将裂解的酵母滤纸放在圆片的顶上, 使其在 30 $^{\circ}$ C 培养约 1 - 2 小时。通过将酵母斑变成蓝色来表明 β - gal 活性阳性的含有 pAS1AKAP 79 和 pACT RII 的二倍体菌株融合。作为对照, 与空 pACT 对照接合时, 饵 AKAP 79 质粒仍为白色。

使 y190A AKAP 79 (分离物 1 和 2) 和 y190a AKAP 79 (分离物 1 和 2) 在每 50ml SC - Trp 培养基中生长到密度为 2×10^7 个细胞/ml 来检测 Gal - 4 AKAP 79 融合蛋白。以 3000 \times g 将细胞离心 10 分钟, 然后在 25 mM Tris pH8, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 2 mM 邻二氮杂菲, 1mM DTT, 25 μ M 4-(2-氨基乙基)-苯磺酰基氟化物 - HCl, 分子量 239.5 (AEBSF), 1 mM benzanidine, 1 μ g/ml PLACC (胃蛋白酶抑制素, 亮肽素, 抑肽酶, 钙蛋白酶 I 和 II), 20 μ g/ml 抑氨肽酶 B 素裂解缓冲液中用 200 μ l 玻璃珠 (大小为 425 - 600 微米) 裂解。再将细胞旋转 1 分钟, 然后在冰上 1 分钟, 共进行 24 分钟 (12 个循环)。确定蛋白质浓度, 将总蛋白质中的 30 μ g 上样到 10 % SDS - PAGE 凝胶上。将凝胶湿转移至 Immobilon-P(Millipore) 上, 通过使用抗 HA 单克隆抗体 12CA5 (Bab Co., Berkeley, CA) 和山羊抗小鼠 IgG 碱性磷酸酶结合的二级抗血清 (Biorad, Hercules, CA) 的标准方法检测。约 100 kDa 的 Gal - 4 AKAP 79 融合蛋白是很容易检测到的, 这表明在这些菌株中存在大小适当的产物。

选择 y190A pAS1 AKAP 79 分离物以筛选 pACT 鼠 T 细胞 cDNA 文库。收集 500 ml SC-Trp 培养物 (OD₆₀₀ = 0.6-0.8), 用 100 ml 蒸馏水洗涤, 然后再沉淀。取出沉淀放在 50 ml LiSORB(100 mM 乙酸锂, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA pH8 和 1M Sorbitol) 中, 转移到 1 升烧瓶中, 在 30 $^{\circ}$ C 以 220 RPM 振荡培养 30 分钟。然后沉淀细胞, 用 625 μ l LiSORB 再悬浮, 接着放在冰上同时制备 DNA 。

将 400 μ l 10 mg/ml 鲑精 DNA 煮沸 10 分钟, 然后加入 500 μ l LiSORB 并使其缓慢冷却到室温。将来自 Mu T 细胞文库的 DNA 以 1 mg/ml 加入 (40 - 50 μ g)。将冰冷的酵母培养物分配到 10 个含 120 μ l 制得的 DNA 的

Eppendorf 试管中。在 30 °C，以 220 RPM 温育试管。30 分钟后，900 μl 在 100 mM 乙酸锂，10 mM Tris pH8 和 1 mM EDTA pH8 中的 40 % PEG₃₃₅₀ 与各培养物混合，然后再培养 30 分钟。集中样品，取小样（5 μl）来检测转化效率并涂布在 SC - Leu-Trp 平皿上。将剩余的细胞加到 100 ml SC - Leu-Trp - His 培养基中，然后在 30 °C 生长，同时以 220 RPM 振荡。将收集的细胞再悬浮在 5.5 ml SC - Leu-Trp - His + 50 mM 3AT（3 - 氨基三唑）培养基中，将 300 μl 的小样涂布在 150 mm SC - Leu-Trp - His + 50 mM 3AT 上，在 30 °C 使其生长 1 星期。

约 4 天后，计数滴定平皿并筛选了 1.1×10^5 个菌落。在文库平皿上完成大规模的 β - gal 试验并从单菌落中分离了 10 个阳性克隆。这些菌落中的一个实际上生长得比其余的大，并将其命名为克隆 11.1。从这些菌株制备总酵母 DNA 并分离 leu2 质粒 DNA。用“获救”的质粒再转化起始 y190ApAS1 AKAP 79 饵菌株和 y190a。在 y190ApAS1 AKAP 79 中，只有克隆 11.1 仍为 β - 半乳糖苷酶活性阳性。作为负对照的含 pACT 克隆 11.1 的 y190a 仍为白色。

用核酸内切酶 XhoI 进行限制消化，释放出一个 2.3 kb 的插入片段，以向前和相反的反向将所述质粒测序。在 ABI 373A 自动测序仪（Applied Biosystems, Inc.）上分析使用在双链模板上的对称聚合酶链反应（PCR）的染料脱氧终止子循环测序试剂盒（Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA）之反应。来自克隆 11.1 的序列有一 487 个氨基酸长（SEQ ID NO: 6）的开放阅读框架，它正好与 pACT 的 Gal-4 活化区融合。检索 NIH 序列数据库，发现该序列与人钙调蛋白依赖的蛋白质磷酸酶（神经钙蛋白）非常同源。克隆 11.1 和人 A1 异构体之间的计算机分析表明：在核酸水平有 80 % 的一致性，在氨基酸水平有 93 % 的一致性（图 3）。在小鼠 11.1 序列中没有人序列中的前 10 个氨基酸和 18 个氨基酸的插入片段。克隆 11.1 与小鼠神经钙蛋白 A β 序列很相近，但在 C 末端明显不同。同样，人神经钙蛋白 A1 和人神经钙蛋白 A2 异构体非常同源，但在其 3' 末端却彼此不同。

通过将含神经钙蛋白 pACT 的菌株与不相关的饵菌株接合来说明 AKAP 79 与神经钙蛋白之间相互作用的特异性。用含有与 RII（1 - 89），酪蛋白激酶 1，磷酸二酯酶 32（HDUN1）和 AKAP Ht31 融合的 pAS1 的菌株，按上述方法完成交换。在所有这些二倍体菌株中，β - 半乳糖苷酶活性均为阴性。

实施例 5

为了进一步评价 AKAP 79 与克隆 11.1 相互作用的性质，构建一系列神经钙蛋白 11.1 缺失突变体并在双杂种系统中检测各质粒。

用相同的 5' 寡核苷酸（MH47）和四个 3' 寡核苷酸（MH48，MH49，MH50 和 MH51）完成 PCR 反应以扩增神经钙蛋白 11.1 中分别编码氨基酸 1

- 104, 1 - 204, 1 - 312 和 1 - 400 的区域。用 BglII 消化这些片段, 然后将其克隆到 pACT 中。用酶切图谱确定方向, 用自动测序确定 PCR 错误。确定正确编码所需缺失突变体的质粒被转化到 y190MATa 和 y190MAT α 中。将酵母菌株与 y190apAS1 和 y190apAS1 AKAP 79 以及编码 SEQ ID NO: 5 6 中氨基酸 1 - 487 的起始克隆 pACT11.1 一起接合。所得的接合平皿按上述过滤检测, 观察到只有编码氨基酸 1 - 400 或氨基酸 1 - 487 的融合蛋白质才能起始所述报告基因的转录。含有氨基酸 1 - 312 的融合蛋白质不能起始转录的观察结果表明 AKAP 79 的接合需要氨基酸 313 - 400 之间的残基。该区域已被证明含有 FKBP/FK506 结合区以及神经钙蛋白 B 结合区 [Husi, et al., J. 10 Biol. Chem., 269:14199-14204(1994)]。

为了更精确地限定 AKAP 79 结合所需的氨基酸序列, 构建并检测用于 AKAP 79 结合的其他缺失突变体。用编码神经钙蛋白 11.1 区 332 - 441, 332 - 487 和 442 - 487 的 pACT 产生表达构建体。象以前一样, 在转化到 pAS1 AKAP 79 酵母菌株之前, 将各构建体测序并确定其是否表达正确的突 15 变体。

但转化后, 未检测到报告基因表达, 这表明突变体不能与 AKAP 79 相互作用。没有 AKAP 79 结合的一种可能的解释是这些截断的克隆丢失了结合所必需的二级结构, 或某些氨基末端序列可能是结合所必需的。

以前的观察已经表明免疫亲和蛋白复合物 FKBP/FK506 与神经钙蛋白 A 20 的相互作用需要神经钙蛋白 B [Haddy, et al., FEBS 314:37-40(1992)]。为了确定在酵母菌株 y190 中内生表达的神经钙蛋白 B 是否参与观察到的 AKAP79/神经钙蛋白 A 结合, 用称为 y153b(Mat a gal14 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3-112+URA::GAL--> lacZ, LYS2::GAL--> HIS3cnb1 Δ 1 : : ADE2)的神经钙蛋白 B⁻ 菌株来消除神经钙蛋白 B 参与神经钙蛋白 A/AKAP 79 25 结合的可能性。先用 pAS1 和 pAS1 AKAP 79 转化 y153, 然后检测在没有牺牲质粒(preymid)情况下的 β - gal 活性。未检测到报告基因的表达, 这表明用克隆 11.1 转化后, 报告基因的表达是 AKAP 79/11.1 结合的必然结果。再通过标准方法, 将质粒 pACT 神经钙蛋白 11.1 和 pACT 神经钙蛋白 1 - 400 30 分别导入到 y153b1 pAS1 AKAP 79 中。在用各质粒转化的菌株中观察到的 β - gal 活性表明 AKAP 79 和神经钙蛋白 A 之间的相互作用不需要神经钙蛋白 B。这样的结果进一步说明免疫亲和蛋白复合物 FKBP/FK506 和神经钙蛋白 A 的结合与 AKAP 79 的结合截然不同。

实施例 6

为了更精确地限定在神经钙蛋白 11.1 上的 AKAP 79 结合区, 构建另一系 35 列编码缺失突变体 (与上述的不同) 或点突变的质粒。

A. 末端缺失

本实施例说明 AKAP 79 与神经钙蛋白 11.1 之间的相互作用需要神经钙蛋白的残基 30 - 336。简而言之，设计在 PCR 反应中所用的对各神经钙蛋白 11.1 区的引物以产生如表 1 中所示的特定 N 末端和 C 末端缺失。在 100 μ l 反应体积中，通过将各 1 μ g 的 3' 和 5' 引物与各 200 μ g dNTPs 和 1 ng 质粒模板和 PCR 缓冲液 #2 (含 20 mM Tris-HCl, pH 8.75, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 和 100 μ g/ml BSA) (Stra 片段 ene), 和 2.5 单位 Pyrococcus Furiosus (Pfu) DNA 聚合酶 (Stra 片段 ene) 混合以产生 PCR 产物。在 95 $^{\circ}$ C 一分钟，在 50 $^{\circ}$ C 2 分钟，在 72 $^{\circ}$ C 4 分钟完成 30 个循环。纯化扩增产物并将其克隆在 pACT 的 BglII 位点。分析所得构建体的 PCR 错误，如前述经测序确定方向。

将各构建体逐个转化到 y190 α , y190a pASI AKAP 79 和 y153b pASI AKAP79 酵母菌株中，分别在实施例 4A 中进行了描述，并按前述完成 β - 半乳糖苷酶过滤检测。用编码 C 末端缺失的第一组载体的结果确定了 AKAP79 结合所需的氨基酸 312 - 400 之间的区域。来自 y153b pASI AKAP79 转化体的阳性过滤检测还证实 AKAP 79 结合不需要神经钙蛋白 B。

以前的研究还表明神经钙蛋白 B 的结合需要氨基酸 348, 349, 355 和 356 [Watanabe et al., J. Biol. Chem. 270:456-460(1995)], 神经钙蛋白自主抑制区包括氨基酸 442 - 487, FKBP/FK506 结合需要氨基酸 350, 353 和 359 [Kawamura and Su, J. Biol. Chem. 270:15463-15466(1995)]。其他编码另外的 C 末端缺失的神经钙蛋白 11.1 构建体表明神经钙蛋白 11.1/AKAP79 结合需要氨基酸 1 - 336。这些缺失表明神经钙蛋白结合区 [所述区在哪儿?], 自主抑制区和神经钙蛋白 B 结合区对于 AKAP79 和神经钙蛋白 A 形成复合物不是必需的。

在表 1 中列出了所有缺失的结合结果。氨基缺失表明 AKAP79 结合所需的至少一个区位于残基 30 - 99 之间。象以前一样，表达 N 末端缺失的 y153b pASI AKAP79 转化体不需要神经钙蛋白 B 结合。

表 1

与神经钙蛋白缺失突变体结合的 AKAP79/免疫亲和蛋白

神经钙蛋白缺失 (由用于构建体表达质粒的引物来命名)	氨基酸序列	AKAP 79 结合	免疫亲和蛋白结合
MH52 - MH58	1 - 487	+	N.D.
MH52 - MH48	1 - 400	+	N.D.
MH52 - MH49	1 - 312	-	N.D.
MH52 - MH50	1 - 204	-	N.D.

MH52 - MH51	1 - 104	-	N.D.
MH66 - MH58	332 - 487	-	N.D.
MH59 - MH58	441 - 487	-	N.D.
MH66 - MH57	332 - 441	-	N.D.
MH52 - MH75	1 - 375	+	+
MH52 - MH74	1 - 354	+	-
MH76 - MH75	30 - 375	+	+
MH77 - MH75	98 - 375	-	-
MH52 - MH93	1 - 347	+	N.D.
MH52 - MH94	1 - 340	+	N.D.
MH52 - MH95	1 - 330	-	N.D.
MH52 - MH96	1 - 320	-	N.D.
MH52 - MH107	1 - 338	+	N.D.
MH52 - MH108	1 - 336	+	N.D.
MH52 - MH109	1 - 334	-	N.D.
MH52 - MH110	1 - 332	-	N.D.
MH52 - MH111	1 - 335	-	N.D.

用于构建表达质粒的引物:

5
 MH48 (SEQ ID NO: 10) 5'-GTATTAGCAGGAGATCTTCCTACTTC-3'
 MH49 (SEQ ID NO: 11) 5'-GTGTGTGTAGATCTGGTGAAAAGTCC-3'
 MH50 (SEQ ID NO: 12) 5'-ATTGTAGAGATCTAAGTAATTAGGTGCCG-3'
 MH51 (SEQ ID NO: 13) 5'-GCCAATTGCTCAGATCTTGTTCCTTATG-3'
 MH52 (SEQ ID NO: 14) 5'-GGAATTCGGATCCTCGAGAGATCTCGCCG-3'
 MH57 (SEQ ID NO: 15) 5'-CCACTTTGAGATCTCTACCGTCTCCAGCC-3'
 MH58 (SEQ ID NO: 16) 5'-CCCTGAGATCTTCAGCTGCTAAGAC-3'
 MH59 (SEQ ID NO: 17) 5'-GGCTGAGATCTGGCAGACCTTGCAAAGTGG-3'
 MH66 (SEQ ID NO: 18) 5'-GTGATGAAGATCTTACAGTTTAATTGCTCTCC-3'
 MH74 (SEQ ID NO: 19) 5'-TTCTCCAGATCTTGGTAAGGACCATG-3'
 MH75 (SEQ ID NO: 20) 5'-CACCTTCTGTAGATCTTTCATCATCAGAAC-3'
 MH76 (SEQ ID NO: 21) 5'-CATCGGCAGATCTCTGAAGAAGTG-3'
 10
 MH77 (SEQ ID NO: 22) 5'-CCATGGCCAATTTTAGATCTCGATGAAAC-3'
 MH93 (SEQ ID NO: 23) 5'-GGACCATGAGATCTAATCCATAAAATTGGG-3'
 MH94 (SEQ ID NO: 24) 5'-AAATGGGAGATCTAATAAGGATGTGGAGAGC-3'
 MH95 (SEQ ID NO: 25) 5'-GGAGAGCAATTAAGATCTAAATGTTTCATCAC-3'
 MH96 (SEQ ID NO: 26) 5'-TTTTCATAGATCTATACAAGCAGCTTT-3'
 MH107 (SEQ ID NO: 27) 5'-CAACCAGATCTAATGTGGAGAGCAATTAAGTTCG-3'
 MH108 (SEQ ID NO: 28) 5'-CCAATAAGAGATCTAAGAGCAATTAAGTTCG-3'
 MH109 (SEQ ID NO: 29) 5'-TGTGAGATCTAATTAAGTTCGAATGTTTCATCAC-3'
 MH110 (SEQ ID NO: 30) 5'-GGAGAGCAGATCTACTGTGCGAATGTTTCATCAC-3'
 15
 MH111 (SEQ ID NO: 31) 5'-AAGGATAGATCTAGCAATTAAGTTCGAATGTTTCATCAC

B. 点突变

为了更精确地评估哪个氨基酸参与 AKAP79 结合, 用 PCR 为基础的策略产生神经钙蛋白 11.1 点突变。产生三个丙氨酸突变, Cys³³⁵ → Ala, Ser³³⁶

→ Ala 和 Pro³³⁹ → Ala, 并根据在双杂交系统中调节 AKAP 79 结合的情况来进行检测。这些突变体中没有一个能够防止 AKAP79 与神经钙蛋白结合, 这表明仅仅对这些残基进行修饰不足以破坏 AKAP79 结合。

实施例 7

5 完成用 pACT Mu T 细胞文库 DNA 和 pAS1 AKAP79 饵菌株进行的另一筛选以使用上述方法鉴定其它 AKAP 79 结合蛋白。来自约 211000 个克隆的筛选结果是得到了一个称为 pACT2-1 的阳性克隆, 在获救(rescue)和再转化后仍为阳性。用 XhoI 消化从质粒中去除文库序列, 表明是一个 1200 bp 的插入片段。测序和随后的数据库检索表明该克隆与大鼠 1 α 型蛋白激酶 A (RI) 的
10 调节亚单位有 91 % 的一致性。

用相同的 AKAP 79 饵再筛选所述文库, 从约 520000 个转化体中得到 15 个阳性克隆。在这 15 个中, 发现其中的 11 个与大鼠 PKA 调节亚单位 I 型同源。将这些分离物中分别与 RI 的 5' 非翻译区融合, 通过起始甲硫氨酸时保持开放。在酶切分析和测序数据的基础上, 分离了 9 个单个的克隆, 包括起
15 始 pACT2-1 分离物。

这些结果首次说明了锚定蛋白同时与 PKA 的 RII 和 RI 调节亚单位结合, 意想不到的, 两个亚单位之间的一级结构不同。

为了进一步确定 RI 和 AKAP79 之间相互作用的序列, 并确定这种相互作用对于 AKAP79 是否是特有的, 开发了新的酵母菌株。利用在 RI 前 400 bp
20 内的 BgIII 位点, 从 pACT72 中分离了编码氨基酸 1 - 80 的片段, 并将其与 pAS1 和 pACT 相连。通过酶切分析确定方向。用标准的酵母转化方法, 将质粒 DNA 导入到 y190 MATa 中, 然后检测被转化酵母的 β - gal 活性。确定截断的 RI 融合产物不能启动报告基因的表达。然后用转化的酵母菌株进行一系列的试验以确定截断的 RI 是否与 AKAP79 发生相互作用。

25 在双倍转化酵母菌株中观察到报告基因的表达, 这表明 RI/AKAP79 结合受 RI 前 80 个氨基酸的影响。

最后, 确定与 RI 和 RII 亚单位的结合是否是 AKAP79 特有的, 用上述含氨基酸 1 - 80 并由质粒 pAS1 (1 - 80) 编码的截断的 RI 肽通过双杂交筛选检测人甲状腺 AKAP[Carr .et al., J.Biol.Chem.267:13376-13382(1992)],
30 pACT Ht31 的基因产物。观察到的 Ht31/RI 结合与以前 Ht31 结合 RII 的观察结果表明锚定蛋白与 RI 和 RII 的结合并不是 AKAP79 特有的。

实施例 8

根据 AKAP79 与 PKA 的 RI 和 RII 均会结合这一事实, 研制了闪烁近似 (proximity) 筛选技术以鉴定通过干扰 AKAP79 与 PKA 的结合而破坏 PKA
35 定位的特异性抑制剂。

首先构建硫氧还蛋白 (TRX) - AKAP79 融合蛋白表达质粒。主要参见

LaVallie 等人, BIO/TECHNOLOGY 11:187-193(1993)。简而言之, 将 XbaI/HindIII 硫氧还蛋白片段亚克隆到含有一个 lac Z 基因和一个 tacZ 启动子的 pUC19 中。所得的质粒称为 TRX F/S pUC19。为了将 AKAP79 编码序列插入到 TRX F/S pUC19 中, 用含有末端 SpeI 和 HindIII 序列的寡核苷酸 (SEQ ID NO: 32) 产生一个 NcoI 位点。SpeI/ HindIII 消化后, 将所述寡核苷酸插入到所述载体中并将编码 AKAP79 的 NcoI/XhoI 片段在框架中与硫氧还蛋白基因相连。在大肠杆菌中表达所述融合蛋白, 并将其固定在 96 孔平皿 (Wallac Turbu, Finland) 中, 所述平皿含有植入固体支持物中的闪烁器。为了固定小鼠 TRX 免疫特异性单克隆抗体, 用兔抗小鼠抗体预涂覆所述平皿。然后经抗 TRX 抗体将 TRX - AKAP79 融合蛋白俘获在所述平皿上, 存在或不

存在参考抑制剂 (reference inhibitor) 如未结合的 RII 的情况下将 ^3H - RII 加到所述平皿中。当 ^3H - RII 与 AKAP79 结合时, 标记被带到充分接近植入支持物中的闪烁器处, 用 MicroBeta 闪烁计数器检测辐射。
来自该试验的结果表明上述未标记的 RII 和 Ht31 肽能够分别以 1 mM 和 50 nM 的 IC_{50} 抑制 AKAP79/RII 结合。这些结果与报告的其他锚定蛋白的值相似 [Carr, et al., J.Biol.Chem. 267:13376-13382(1992)]. 上述脯氨酸取代的 Ht31 肽并未阻断 AKAP79/RII 结合。由于这些结果与在以前 Western 印迹和涂覆试验中观察到的一致, 因此, 认为这项技术可以迅速筛选 AKAP79/RII 结合的潜在抑制剂, 以及 AKAP79 与其他已知生理配对物, 如神经钙蛋白和蛋白激酶 C 结合的抑制剂。

实施例 9

本实施例说明在 T 细胞中 PKA 与锚定蛋白的结合调节 PKA 对 NFAT 活化的活性, 由此调节白介素 2 的产生。

IL - 2 基因的表达与 T 细胞活化紧密相连。用 PMA 和伊屋诺霉素激活后, 研究 IL - 2 的转录。已知这两种试剂分别促进蛋白激酶 C 和钙第二信使反应 (包括 CaN 的活化)。蛋白激酶 C 激活参与 NFAT 核成分诱导的 Ras-Raf-1-Mek-MAP 激酶途径。增加的钙浓度激活了神经钙蛋白, 然后神经钙蛋白又激活了 NFAT 的胞质成分并转移到核中。NFAT 成分的活化包括 IL - 2 基因表达。为了定量转录, 用一载体稳定转染 JurkatT 细胞系 (NFATZ), 所述载体含 3 个串联拷贝的 NFAT 结合位点, 和编码 β - 半乳糖苷酶 (β - gal) 的 lacZ 基因融合的哺乳动物 IL - 2 启动子。通过 β - gal 的荧光激活细胞分类器 (FACS) 分析来确定 IL - 2 转录的量。

一般情况下, 在 37 °C 1 ml 培养基中的 1×10^6 NFATZ 细胞与不同浓度的环孢菌素, 包括 AKAP75 (SEQ ID NO: 8 ; Glantz 等人, J.Biol.Chem., 268:12796-12804(1993), 该文献引入本文作为参考) 的氨基酸 81 - 108 的肉豆蔻酸化 (myristilated) 肽, PKI (PKA 抑制剂肽)

(GRRNAIHDI - SEQ ID NO: 5) 和 Ht31 肽 (SEQ ID NO: 9 , Carr et al., J.Biol. Chem.,267:13376-13382(1992)中描述的全序列 Ht31 蛋白质的氨基酸 493 - 515,它阻断锚定蛋白与 PKARII 亚单位的相互作用, 该文献引入本文作为参考) 一起预保温 60 分钟。按 Eichholtz 等人 (J.Biol. Chem., 5 268:1982-1986(1993)) 所述将所述各肽肉豆蔻酸化。

在用环孢菌素, PKI (SEQ ID NO: 5) 和 Ht31 肽 (SEQ ID NO: 9) 的试验中, 与环孢菌素或相应的肽一起保温后, 再与二萜衍生物 (25 μ M) 异丁基 - 甲基 - 黄嘌呤 (IBMX; 0.1 mM) 一起保温 30 分钟。与二萜衍生物/IBMX 一起保温增加了细胞内的 cAMP 浓度 (图 4), 由此激活了 PKA。最后加入佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13 乙酸酯 (PMA) (10 ng/ml) 和伊屋诺霉素 (2 μ M) 并继续培养 4 小时。对照只与 PMA/伊屋诺霉素或二萜衍生物/IBMX 和 PMA/伊屋诺霉素在上述条件下培养。在进行 PMA/伊屋诺霉素培养的后 20 分钟, 加入氯喹 (300 μ M) 以抑制内生溶酶体 β - gal 活性。将细胞离心并再悬于 50 μ l 培养基中, 向其中加入 50 μ l 荧光素二 β - D - 吡喃半乳糖苷 (FDG) (0.1mM 的终浓度; 分子探针)。使渗透休克过程持续 15 75 秒, 然后通过加入 1 ml 冷 FACS 缓冲液 (包括氯喹) 而使细胞返回等渗条件。通过用于荧光素分析的流式细胞计数测量 lacZ β - gal 活性。

图 5A - 5H 说明了本试验的结果。图 5A 和 5B 是加入了或未加染料的试验的背景荧光的 FACS 图。图 5C 表示用 PMA/伊屋诺霉素处理 NFATZ Jurkat 20 细胞使 β - gal 活性增加了 6 - 7 倍。正如预期到 CaN 在 IL - 2 转录中的重要信号作用一样, 环孢菌素 (CsA) 完全破坏了这种活性 (图 5D)。当在培养基中使用 10 μ M 的肉豆蔻酸化 AKAP 75 肽 (SEQ ID NO: 8) 时, 发现 PMA/伊屋诺霉素诱导的 β - gal 活性降低了 40 - 50 %。

图 5E 表明二萜衍生物和 IBMX 使 PMA/伊屋诺霉素诱导的 β - gal 活性 25 降低了约 50 %。用 100 μ M 肉豆蔻酸化的 PKI 肽 (SEQ ID NO: 5) 和 100 μ M 肉豆蔻酸化的 Ht31 肽 (SEQ ID NO: 9) 可以完全恢复这种抑制 (图 5F 和 5G)。图 5H 表示带有脯氨酸取代的肉豆蔻酸化的 Ht31 肽并不影响二萜衍生物/IBMX 阻断, 已知所述取代使所述肽在阻断 PKA 锚定时失活。这些结果表明了 PKA 的重要性以及它通过在调节 IL - 2 基因表达中的锚定蛋白 30 而定位。如上所述, 可以用干扰 PKA 活性或定位来增强免疫反应, 激活用于选择性克隆扩展的 T 细胞或研究 T 细胞激活的早期过程。

实施例 10

鉴定编码另一蛋白质相同区域的两个单独的分离子 pACT 59 和 pACT 74。这些克隆的序列分别列在 SEQ ID NO: 33 和 34 中。胚细胞检索结果表明与三个未知功能的基因产物有显著的氨基酸同源性: C. elegans (319 个氨基酸的蛋白质, 在数据库目录中称为 No. U00032), 人胎儿脑表达的序列片 35

段(97个氨基酸的蛋白质,称为T08697),和HL60表达的序列片段(90个氨基酸的蛋白质,称为D20731)。还在称为PADI⁺的*S.pombe*基因产物(308个氨基酸的蛋白质,产物D31731)之间发现了同源性,已知所述基因产物是PADI⁺的正调节因子,AP-1样转录因子。

5 另外,用这种筛选方法还鉴定了另两个阳性克隆:pACT36,编码与Gal4正确融合的143个氨基酸的开放阅读框架,和pACT60,编码因一明显缺失而产生的稍微短一点的区域。分别在SEQ ID NO: 35和36中列出了这些克隆的序列。这两个分离物彼此是独特的,而且与在NIH中的任何已知序列均没有一致性。

10 实施例 11

以前的工作表明AKAP79是一个多功能的锚定蛋白,能够与至少两个信号酶发生关联;PKA和Ca²⁺/钙调蛋白依赖性磷酸酶神经钙蛋白(CaN)。各信号酶与锚定蛋白的不同区结合,锚定后所述酶受到抑制。另外,已经表明Ca²⁺/磷脂依赖性蛋白激酶C(PKC)在不同于PKA和CaN的区域也与AKAP79结合。象PKA和CaN一样,PKC的活性通过它与锚定蛋白结合而受到抑制。在锚定蛋白的前75个残基内含有PKC结合位点,肽研究表明含有AKAP79残基31-52的片段抑制PKC活性。此外,有证据表明钙调蛋白(CaM)与锚定蛋白结合可以释放PKC活性,这说明AKAP79序列的竞争。为了更全面地表征PKC结合位点,从牛脑中分离PKC/AKAP复合物并确定CaM是否是PKC/AKAP79相互作用的生理调节因子。

20 用兔脑PKC作为探针,首先在牛脑裂解产物上完成PKC涂覆。用识别PKC α 和 β 异构体的单克隆抗体(M7)检测PKC结合。在50-300kDa内检测到数个PKC结合蛋白,包括与明显的75kDa RII结合蛋白有相似迁移率的蛋白质。对照试验表明PKC结合是特异性的,而且只有存在1.2mM CaCl₂和20 μ g/ml磷脂酰丝氨酸并将PKC加到反应混合物中时,才能检测到。

25 为了确定鉴定的75kDa蛋白质是否可能是AKAP79的牛同源物,用PKC涂覆试验探测AKAP79和有关的片段。简而言之,用SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,然后按标准方法印迹到硝酸纤维素膜上。在Blotto[1mg/ml牛血清白蛋白(BSA),5%在Tris缓冲盐(TBS)中的干奶]中阻断样品,然后在室温检测缓冲液[含1mg/mlBSA,1.2mM钙,1mM EGTA,20 μ g/ml磷脂酰丝氨酸(PS),2 μ g/ml亮肽素,2 μ g/ml胃酶抑素,和3 μ g/ml部分纯化的兔脑PKC的TBS]中保温1小时。按标准化学发光检测法,用识别PKC α 和 β 的单克隆抗体M7检测结合的PKC。

35 PKC与全序列重组AKAP79蛋白质结合,含所述蛋白质前75个残基的重组片段结合PKC,但覆盖CaN和RII结合区的C末端不结合。对照试验表明,³²P-放射性标记的RII与全序列AKAP79和C末端都结合。这些结果说明

AKAP 79 是 PKC 结合蛋白, 而且主要的结合位点在所述蛋白质的前 75 个氨基酸内。

5 以前对 PKC 结合蛋白的研究已经说明来自 PKC 结合位点的碱性和疏水区参与了与所述酶的磷酸脂键的形成。AKAP 79 的前 75 个残基在位置 31 - 52 之间含有碱性和疏水区, 而一些迹象表明该区域是与 PKC 接触的主要位点。正如用涂覆试验评估的, 残基 31 - 52 的合成肽阻断 PKC/AKAP 79 相互作用。

10 为了检测这些肽调节 PKC 活性的能力, 在存在和不存在 AKAP 79 肽片段的条件下, 完成下列试验。将 PKC[50nM, 裂解在 50 mM Tris-HCl(pH7.4), 5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 1mM DTT, 1 mM EGTA 和 100 μg/ml PS 中]与 EGF 受体肽底物 (5 μM) 在 30 °C 保温 5 分钟。通过加入 100 μM ³²P - ATP (500 cpm/pmol) 而启动磷酸化反应, 使反应在 30 °C 进行 10 分钟。取反应样品, 点到 P81 滤纸上, 用过量 75 mM 磷酸洗涤滤纸而终止反应 (洗 3 次, 每次 3 分钟)。最后用乙醇洗涤, 干燥 P81 滤纸, 用液体闪烁计数器测量放射性。

15 含有残基 31 - 52 的肽和 AKAP 79 前 75 个氨基酸的重组片段分别是 IC₅₀ 为 2 μM 和 25 nM 的 PKC 活性的有效抑制剂。更详细的动力学分析表明用表皮生长因子 (EGF) 受体肽为底物, AKAP79 31 - 52 肽表现出混合的 PKC 活性抑制作用, K_i 为 1.411 ± 0.28 μM。另外, 该区还类似 CaM 结合区, 将重组 1 - 75 片段或 31 - 52 肽在存在过量 Ca²⁺ 的条件下, 与防止 PKC 抑制的 CaM (15 μM) 一起保温。由于 AKAP 79 是 CaM 结合蛋白, 所以这些发现表明 Ca²⁺/CaM 可以调节 PKC 与锚定蛋白的结合。

20 综上所述, 这些结果表明 PKC 在体外与 AKAP79 结合, PKC 结合位点在 AKAP79 的前 75 个残基内, 而且含残基 31 - 52 的肽抑制 PKC 活性。结果还表明象与过量 Ca²⁺/CaM 保温可以防止 31 - 52 肽产生的 PKC 抑制作用一样, 由 CaM 可以调节 PKC/AKAP 79 间的作用 (图 3)。为了更全面地了解 AKAP 79/PKC 作用的本质, 设计实验以 1) 鉴定对于 PKC 与 AKAP 79 结合起重要作用的残基, 2) 从细胞中分离 PKC/AKAP 79 复合物和 3) 确定 CaM 是否可调节 PKC/AKAP 79 间的作用。

30 数种 PKC 结合蛋白的序列分析表明与 PKC 结合可能需要高的正表面电荷。这种假设与以前的结果一致, 其中含有碱性和疏水残基簇的 AKAP79 氨基酸 31 - 52 的肽片段抑制 PKC 活性 (K_i 为 1.4 ± 0.28 μM), 而该区域的重组片段甚至是更强的所述激酶抑制剂 (IC₅₀ = 25 ± 5 nM)。为了评价位于 AKAP 79 残基 31 - 52 的碱性侧链作为 PKC 抑制决定簇的作用, 在含氨基酸 - 75 的重组 AKAP 79 多肽中产生一系列的 AKAP 79 突变体, 用涂覆方法和对 PKC β I 抑制能力的变化来检测各突变体的 PKC 结合特性。

构建了 5 个 AKAP 79 突变体，其中用丙氨酸取代碱性残基簇。假设有高密度的正电荷，在记录到 PKC 结合亲和性的显著变化前就可能需要同时取代数个碱性侧链。因此，多个碱性残基被取代。利用 Hausken 等人[J. Biol.Chem. 269:24245-24251(1994)]描述的方法，通过丙氨酸扫描诱变产生 AKAP 79 序列中的点突变。将各 AKAP79 蛋白表达为 His-片段融合蛋白，并用镍亲和层析纯化至均一。下文列出了所述丙氨酸突变肽。 SEQ ID NO: 37 是天然的 AKAP 79 序列。

- AKAP 79 (37-50) FXRRKKAALKALAPK (SEQ ID NO: 37)
- AKAP 79 AA38,39 FAARKKAAKALAPK (SEQ ID NO: 38)
- AKAP 79 AAA40-42 FKRAAAAALAPK (SEQ ID NO: 39)
- AKAP 79 4A38-42 FAAAAAAALAPK (SEQ ID NO: 40)
- AKAP 79 AA45,50 FKRRKAAAALAPA (SEQ ID NO: 41)
- AKAP 79 A37-50 FAAAAAAAAALAPA (SEQ ID NO: 42)

在棒状病毒中表达 PKC β I，通过下列方法，用单克隆抗体 M4 和 M7 检测 PKC α 和 β 异构体。

此外，用上述方法检测各 AKAP 79 片段突变体抑制 PKC 的能力。

由于最初的数据表明 PKC 和 AKAP 79 体外结合，那么如果在体内发生相同或相似的结合，就有可能从细胞中分离 AKAP 79/PKC 复合物。为了从牛脑中分离 PK/AKAP 79 二元复合物或 PKC/AKAP 79/CaN 三元复合物，使用两种独立的生物化学方法，以前用这些方法成功地分离了体内 AKAP 79/CaN 复合物。所述技术简述如下。

开始的研究涉及用抗 AKAP 79 的单克隆抗体 MC16 免疫沉淀来自牛脑的 AKAP79 同源物，AKAP 75。用可识别主要的脑 PKC 异构体 α ， β I， β III 和 γ 的兔多克隆抗血清，通过 Western 印迹检测在免疫沉淀物中共纯化的 PKC。另外，用识别脑 PKC α 和 β 异构体的单克隆抗体 M7 从牛脑提取物中免疫沉淀 PKC，然后用 RII 涂覆或 Western 印迹检测共纯化的 AKAP75。

最后，用识别牛 CaNA 亚单位的单克隆抗体 C24 探测用抗 PKC 抗体免疫沉淀的相同样品中的 CaN。这些试验可以确定是否形成了三元 AKAP79/PKC 和 CaN 复合物。

另外，完成亲和纯化以便从牛脑中分离 RII，AKAP 79 和 PKC 的三元复合物。在 cAMP 琼脂糖上通过亲和层析纯化 PKA 的 R 亚单位，分别用 M7 和 MC16 单克隆抗体，通过 Western 印迹筛选洗脱物中存在的 PKC 和 AKAP。由于重组 AKAP 79 和 PKC 并不结合 cAMP 琼脂糖，所以检测在 cAMP 洗脱

物中的蛋白质可以确定是否形成了激酶和锚定蛋白复合物。用过量的锚定抑制肽，通过从 cAMP 琼脂糖中洗脱 PKC 和 AKA79 来确定三元复合物。已表明所述肽从固定在 cAMP 琼脂糖上的 RII 中置换 AKAP/CaN 复合物。

实施例 12

5 已表明 AKAP 79 结合神经钙蛋白，这是与神经钙蛋白是两种有效且有临床意义的免疫抑制剂，环孢菌素和 FK505 的靶有关的，所述环孢菌素和 FK506 均能抑制神经钙蛋白的活性。如上所述，环孢菌素和 FK506 在各种疾病的治疗中均是有用的，但是有明显的副作用。设想调节锚定蛋白/神经钙蛋白结合的因子可以最终以与环孢菌素或 FK506 活性相似的方式调节神经钙蛋白活
10 性。所述的调节剂的鉴别，特别是与其他免疫抑制剂相比有较小副作用的那些，就可能在治疗目前用环孢菌素或 FK506 治疗的许多疾病中有广泛的治疗用途。

已经报告了许多环孢菌素和 FK506 的临床指征。例如，环孢菌素已被确定为移植后的标准免疫抑制剂，甚至尽管通常认为 FK506 是一种更强的免疫
15 抑制剂，但仍使肝、肺、肠和胰腺移植成为可能。对于不耐受或不能用环孢菌素或 FK506 的移植患者有时可成功地换其他药物。

作为另一实例，炎性肠病 (IBD) 是有两种不同临床表现的疾病，节段性回肠炎和溃疡性结肠炎(UC)的通用术语。已经用环孢菌素成功地治疗节段性回肠炎，在至少一种疾病活性指数上已经有统计意义的显著治疗效果
20 [Brynskov, Dan.Med.Bull. 41:332-344(1994)]。然而，与急性恶化情况的解决最相关的其他指数并没有明显改善的迹象。环孢菌素还在严重的急性抗类固醇 UC 中有活性 (由于伦理上的原因而终止了试验，所以数据不显著)。患硬化胆管炎和 UC 的患者的试验表明对 UC 缓和期来说界限显著。在中止并因毒性而限制治疗后常常复发 [Choi and Targan, Dig. Dis. and Sci. 39:1885-
25 1892(1994)]。另外，在 IBD 中还成功地使用了其他免疫抑制剂，如氨甲蝶呤，硫唑嘌呤和 6 - MP。

作为另一实例，在一些试验中，当用环孢菌素作为疾病的第二或第三线治疗方法时，即用其他成熟的治疗方法不成功并且有严重的疾病的患者，环孢菌素在治疗类风湿性关节炎中是有效的。在这些试验中，发现环孢菌素与
30 第二线药物，如金、抗疟药，硫唑嘌呤，D-青霉胺 1 和氨甲蝶呤有一样效果和毒性 [Wells and Tugwell, Br.J.Rheum., 32(suppl 1):51-56(1993);Forre et al., Arth.Rheum., 30:88-92(1987)] 由于环孢菌素的“潜在不可逆毒性”，这些试验仅报告了治疗“很严重的，难治的活性 RA” [Dougados and Torley, Br.J.Rheum., 32(suppl 1):57-59(1993)]。认为肾毒性主要是通过肾血管收缩介
35 导的，所述肾血管收缩会加重 NSAID 肾毒性和类风湿性关节炎本身的肾病 [Leaker and Cairns, Br.J.Hosp. Med., 52:520-534(1994);Sturrock et al.,

Nephrol.Dial.Transplant, 9:1149-1156(1994);Ludwin and Alexopolulou, Br.J.Rheum., 32(suppl 1):60-64(1993)]. 约 10 % 来自用环孢菌素治疗的 RA 患者的肾解剖表明了环孢菌素毒性的形态学特征[International Kidney Biopsy Registry of Cyclosporin in Autoimmune Diseases, Br.J.Rheum., 32(suppl 1):65-71(1993)].

还有另一实例，已经报告了环孢菌素对于治疗类固醇依赖性气喘是有效的。在一个试验中，给少量的患者随机施用环孢菌素或安慰剂，环孢菌素组的空气流量和 FVC 增加，泼尼松龙的解毒期减短。

另一实例是表明环孢菌素在治疗类固醇依赖性微小病变肾病综合症中是有效的。在该试验中，环孢菌素剂量低时，患者有较低类固醇需求，但当停止环孢菌素用药时全部复发。抗类固醇肾病综合症对环孢菌素只有 20 - 30 % 的反应率[Meyrier, Nephrol.Dial.Transplant ,9:596-598(1994);Hulton et al., Pediatr.Nephrol.,8:401-403(1994)].

从系统性红斑狼疮(SLE)的治疗来看，一项研究报告说在前瞻的非随机化，无对照组的试验中，SLE 活性指数有显著的降低[Tokuda et al., Arthr.Theumat.,37:551-558(1994)]. 而其他研究未表明在 SLE 中是有效的。

另一实例是，在开始出现的早期，环孢菌素会介导胰岛素依赖性糖尿病的缓解。平均缓解约一年，尽管有些长达 850 天[Jenner et al., Diabetologia ,35:884-888(1992);Bougneres et al., Diabetes ,39:1264-1272(1990)]. 在一项研究的扩大的随访中，环孢菌素没有持续的长期效果[Martin et al., diabetologia, 34:429-434(1991)]. 但在另一研究中，在治疗的 12 - 18 个月中肾功能恶化，并不能恢复到安慰剂水平，这表明可能发生了一些慢性肾损伤[Feldt-Rasmussen et al.,Diabetes Medicacine ,7:429-433(1990)]. 早期的发明需要提高对胰岛素依赖性糖尿病密期的免疫移植治疗效果。有些研究者正在筛选最相关的物质并成功地预防性地治疗有糖尿病迹象的患者[Elliott and Chase Diabetologia ,34:362-365(1991)].

还有另一实例，用环孢菌素可以治疗某些牛皮癣[Cuellar et al.,Balliere's Clin.Rheum., 8:483-498(1994);Ellis et al.,JAMA 256:3110-3116(1986)]. 高剂量治疗对于牛皮癣关节炎，特别是破坏性关节炎的严重情况是有效的，治疗中止后，通常会加重皮肤和关节病。从潜在的副作用和需要连续的长期治疗来看，环孢菌素只对用其他方法不能治疗的难以医治的牛皮癣关节炎有效。

另外，在安慰剂控制的双盲研究中，环孢菌素对于治疗严重的特应性皮炎是有效的 [Van Joost et al.,Br.J.Derm.,130:634-640(1994);Cooper, J.Invest.Derm., 102:128-137(1994)]. 比起未治疗的疾病，患者宁愿接受因药物而产生的恶心、腹部不适、感觉异常、胆汁郁积和肾功能不全的副作用。另一随机化的双盲安慰剂控制研究发现环孢菌素治疗显著的提高患严重特应性

皮炎的患者的生活质量[Salek et al., Br.J.Derm.,129:422-430(1993)]. 在停止环孢菌素用药后, 皮肤损伤迅速复发, 但生活质量仍得到保持。

5 作为另一实例, 已经用环孢菌素来治疗手的慢性皮炎(其报告的发生率为4 - 22%, 通常用局部类固醇来治疗, 但该药对许多患者无效。在一项开放研究中, 低剂量的环孢菌素能有效地治疗6/7的患者[Reitamo and Granlund ,Br.J.Derm.,130:75-78(1994)]. 在停用环孢菌素后, 约一半的患者复发。

10 作为另一实例, 已经用环孢菌素来治疗荨麻疹和血管性水肿, 表现为荨麻疹和皮下肿胀的特发性皮肤病。病理与肥大细胞有关, 治疗常常无效。在一项试验中, 用环孢菌素治疗患难治的荨麻疹和血管性水肿的三名患者, 所有症状均在一星期内消除[Fradin et al., J.Am. Acad.Derm.,25:1065-1067(1991)]. 由于副作用, 所有患者不得不停止治疗, 而且在治疗停止后, 症状复发。

15 关于其他风湿病, 研究报告说环孢菌素在治疗其他不太常见的自身免疫性疾病, 包括白塞病[Pacor et al., Clin. Rheum., 13:224-227(1994)], Wegner's 肉芽肿病[Allen et al.,Cyclosporin A Therapy for Wegner's Granulomatosis in ANCA-Associated Vasculitides:Immunological and Clinical Aspects ,Gross ed.Plenum Press (1993)]和免疫介导的血小板减少症[Schultz et al.,Blood 85:1406-1408(1995)]方面是有效的。

20 在上述的许多试验中, 环孢菌素或FK506的使用会带来许多不必要的副作用。通常, 感染和恶性肿瘤危险的增加与一般的免疫抑制相关, 锚定蛋白相关的免疫抑制不会没有相似的危险。但通过锚定蛋白组织特异性可以避免或降低其他副作用。环孢菌素和FK506最常见的严重副作用是肾毒性, 至少在某种程度上是与剂量相关的, 而且在大多数患者中均可能发生, 主要是在治疗期间降低肾小球的滤过率。但当中止药物时, 至少部分副作用是可逆的
25 [Leaker and Cairns. 同上文]。通常进行性肾功能不全不会发展, 尽管需要更多的随访来进行确定的评价。在接受低剂量(3 - 4 mg/kg/d)环孢菌素的患者中也会观察到慢性损伤, 这些患者活检的40%都有间质纤维化, 血管萎缩和动脉并发症(arteriolopathy)的变化[Svarstad et al., Nephrol.
30 Dial.Transplant,9:1462-1467(1994); Young et al.,Kidney International,46:1216-1222(1994)]。在组织切片中, 内皮细胞的变化也很明显[Kahan ,N.Engl.J.Med.,321:1725-1748(1989)]. 尽管表明药物也对血管细胞和血管间质细胞有直接毒性[Platz et al.,transplantation ,58:170-178(1994)], 但认为肾毒性主要是由于小动脉血管收缩和慢性低级局部缺血而造成的[Leaker and
35 Carins. 同上文]。有些报告表明使用FK506, 肾毒性的发生率和严重程度可能稍微高一点[Platz et al.,同上文]。

环孢菌素和 FK506 的另一显著毒性是神经毒性，临床表现包括癫痫发作，精神错乱，失明，昏迷，头痛，共济失调，帕金森综合症，感觉异常，精神病，聚焦缺乏（focal deficits），运动不能性缄默症，震颤，神经病和睡眠障碍[Shimizu et al., *Pediatr.Nephrol.*,8:483-385(1994);Wilson et al.,*Muscle and Nerve* ,17:528-532(1994);Reece et al.,*Bone Marrow Transpl.*,8:393-401(1991);Eidelman et al., *Transpl.Proc.*,23:3175-3178(1991);de Groen et al.,*N.Engl.J.Med.*,317:861-566(1987)]。在肝移植后，在用 FK506 治疗的 10 - 20 % 的患者和用环孢菌素治疗的 3 - 12 % 的患者中发生了中等程度到严重的神经中毒。神经中毒还与血清脂异常和肝功能障碍有关。

环孢菌素和/或 FK506 的其他副作用包括肝毒害性，葡萄糖不耐受症，高血压，多毛症，胃肠综合症，静脉血栓形成，胰腺炎和龋增生[Morris J.*Heart Lung Transplant*, 12:s275-s286(1993);Fung et al., *Transpl.Proc.*,23:3105-3108(1991);Mason ,*Pharmacol,Rev.*,42:423-434(1989);Kahan,*N.Engl.J.Med.*,321:1725-1738(1989);Thomason et al.,*Renal Failure* 16:731-745(1994)]。因此，从广泛利用环孢菌素和 FK506 及其利用所带来的固有副作用来看，开发另一种免疫抑制剂可能是极其有益的。

例如，从推测的 T 细胞锚定蛋白使神经钙蛋白去定位可以抑制在 T 活动抑制中的神经钙蛋白活性，由此提供有环孢菌素或 FK506 利用性的 T 细胞特异性免疫抑制，但副作用较低。前面观察到 PKA 从 T 细胞锚定蛋白的去定位，可以提高 IL - 2 在受刺激的细胞中的表达，这表明锚定蛋白定位的 PKA 在 T 细胞激活过程中以一定的方式在 IL - 2 表达中起调节作用。因此，PKA 的 T 细胞特异性去定位可以提供一种提高 IL - 2 体内分泌的方法，由此模拟重组 IL - 2 的施用并可能降低以前报道的如下文描述的 IL - 2 毒性。

IL - 2 已被允许治疗转移性肾癌，而且 15 - 20 % 患转移性肾细胞癌或恶性黑瘤的患者对 IL - 2 治疗有反应。这些反应中的一部分是可持续的，持续达 66 个月以上[Dillman, *Cancer Biotherapy* ,9:183-209(1994);whittington and Faulds, *Drugs* 46:446-514(1993)]。高剂量的单次快速注射治疗与几种严重的副作用(如下所述)相关，低剂量皮下或连续输注治疗会产生中度的反应率(12%)，但毒性降低[Vogelzang et al.,*J.Clin.Oncol.*,11;1809-1816(1993)]。

已经在其他恶性肿瘤的治疗中研究了 IL - 2 治疗(带和不带 α 干扰素和其他试剂)。例如，在神经胶质瘤切除后，发现将 IL - 2 直接用于瘤床就会有持续的临床反应，但不能治愈[Merchangt et al., *J.Neuro.*,8:173-188(1990)]。在其他试验中，在淋巴瘤[Dillman, 同上文]，结肠癌[Whittington and Faulds, 同上文]，有限的 AML[Bruton and Koeller ,*Pharmacotherapy* 14:635-656(1994)]，卵巢癌和早期膀胱癌[Whittington and faulds, 同上文]中报告有有限的疗效。但各试验的参与者太少而不能得出有关有效性的显著结论。

还将 IL - 2 与继承性免疫治疗相结合, 而且表明对于治疗转移性肾癌是有效的 [Pierce et al., Sem.Oncol.,22:74-80(1995);Belldegrun et al., J.Urol.,150:1384-1390(1993)]. 另外, 通过降低皮肤细菌负载和通过皮下注射降低麻风病患者的抗原水平, IL - 2 对于治疗特定的感染性疾病也是有效的 [Kaplan, J.Infect.Dis., 167(suppl 1): s18-22(1993)]. 还观察到, 与 PPD 阳性健康对照相比, 结核病患者的淋巴细胞产生较低水平的 IL - 2 [Sanchez et al., Inf.Immun.,62:5673-5678(1994)], 这表明 IL - 2 在治疗分支杆菌的感染中是有价值的。

尽管 IL - 2 有潜在的治疗价值, 但这种细胞因子仍有显著的毒性 [除特别说明, 来源是 Whittington and faulds, Dillman and Bruton and Koeller, 同上文]. 治疗上主要的副作用是毛细血管渗漏综合症。IL - 2 治疗增加了血管的通透性引起间质和肺水肿, 相当多患者发展成需增压药的低血压。强烈的液体回生导致威胁生命的肺水肿。高达 20 % 的患者需要插管和机械通气。高剂量的单次快速注射会引起比低剂量或慢输注更严重的渗漏, 在有些方案中, 在 IL - 2 治疗期间 100 % 的患者需要 ICU 支持。还观察到心肌炎, 心肌病和心率失常。由毛细血管渗漏综合症诱导的 sypotension 还可能发生急性肾衰竭。

IL-2 还会引起腹泻, 同时伴有电解质失衡, 胆固醇沉着病, 甲状腺异常和急性胰腺炎。15 - 20 % 治疗过的患者发生需要输注的贫血 [MacFarlane et al., Cancer 75:1030-1037(1995)]. 可能会发生伴有出血的血小板减少症, 凝血途径缺陷是常见的。70 % 以上的患者经历了精神状态的变化, 包括偏执狂样妄想, 幻想, 兴趣丧失, 睡眠障碍和倦睡。还报告了昏迷, 视觉缺陷, 暂时性脑缺血发作和感觉异常。与外源 IL - 2 有关的这些缺陷表明, 应开发其它的潜在疗法例如可以调节内源 IL - 2 的产生, 从而减少对外源 IL - 2 治疗的需求。

除提供可能的方法以鉴定免疫抑制药物和 IL - 2 生产调节剂外, 锚定蛋白的鉴定使得通过已表明锚定蛋白参与其中的不同代谢途径调节其他细胞活性成为可能。例如, 在神经元突触后密质中, 推测 AKAP79 可能经结合 PKA, PKC 和神经钙蛋白在调节谷氨酸受体调节的离子通道方面起重要作用。PKA 调节 AMPA 受体调节通道的活性, PKA 的去定位或抑制减弱了 AMPA 离子通道活性。PKC 调节 NMDA 受体调节通道的活性, 已经表明神经钙蛋白减弱 NMDA 受体对刺激的敏感度。这些观察结果表明定位的激酶 (PKA 和 PKC) 可以调节神经元中谷氨酸受体的活性。由神经钙蛋白去磷酸化是 NMDA 受体的计数调节机制。该模型在生理上与由环孢菌素或 FK506 诱导的癫痫发作是一致的。

另外, 谷氨酸受体与许多神经性疾病有关。谷氨酸和其他兴奋性氨基酸可以在神经元中产生兴奋毒性 (excitotoxicity), 而且已经表明突触后谷氨

酸受体的过度刺激对神经元有毒，会导致急性神经元变性。已经表明氧不足（如中风或心搏骤停后）和 CNS 损伤会使谷氨酸明显地泻流到细胞外空间，然后与谷氨酸受体相互作用，从而引发兴奋毒性级联反应。已经在动物模型中表明抗兴奋剂可以抵御脑损伤 [Olney, *Neurobiology of Aging*, 15:259-260(1994)]。令人感兴趣的是，NMDA 拮抗剂对有些类型的神经元是有毒的，这表明谷氨酸可能在那些细胞中抑制其他兴奋途径。大环内酯抗体，如 FK506 也抗 NMDA（但不抗 kainate）在培养的神经元中的兴奋毒性 [Manev et al., *Brain Res.*, 624:331-335(1993)]。

谷氨酸也与帕金森综合症有关。在暴露于 MPTP 的猴黑质中 NMDA 拮抗剂保护多巴胺能神经元，MPTP 是一种在人和其他灵长类中诱发帕金森综合症的化学物质。金刚胺和二甲金刚胺是 NMDA 拮抗剂并已在欧洲用于治疗帕金森综合症，但是两种药物在某些患者中均会引起精神病。还有些迹象表明谷氨酸能神经元在帕金森病中活动过强，其抑制可以降低该病的运动症状 [Lange and Riederer, *Life Sciences*, 55:2067-2075(1994)]。

谷氨酸还在癫痫发作中起作用，参与发作的开始，扩散和保持。NMDA 和非 NMDA 拮抗剂是潜在的抗惊厥药 [Meldrum, *Neurology*, 44(suppl 8):S14-S23(1994)]。AMPA 受体还与 ALS 有关，目前正在进行一系列的受体拮抗剂试验。⁴⁹

从总的这些结果看，大量其他免疫抑制剂正在临床试验中并不使人感到惊奇。有关这些试验的信息来自 Haydon and Haynes, *Balliere's Clin. Gastroenterol.*, 8:455-45(1994); Thomason and Starzi, *Immunol. Rev.* 1993, 71-98(1993); 和 Morris J. *Heart Lung Transplant.*, 12:S275-S286(1993)。例如，azaspirane 是一种 SKB 化合物，抑制移植细胞渗入物和 IL - 2R 诱导，并破坏 IL - 2 和 IFN - γ 生产。显然，azaspirane 诱导某些类型的抑制细胞，而且有些与环孢菌素有协同效果。

作为另一实例，麦考酚酸 mofetial 是一种 Syntex 产化合物，抑制嘌呤合成，并有 T 和 B 细胞选择性抗生殖作用。它减少抗体。麦考酚酸 mofetial 还减少来自细胞表面的粘附分子。而所述药物的毒性明显很低，它可能会引起白细胞减少，并已经用其治疗牛皮癣达 20 年。

作为另一实例，咪唑立宾是一种抑制 DNA 合成的 Sumitomo 产化合物。其作用机制与麦考酚酸的相同。

作为另一实例，brequinar 是通过阻断二氢乳清酸脱氢酶而抑制嘧啶合成的 DuPont-Merck 产化合物。正在等待临床试验的全部结果。已经报告该药物可与环孢菌素协调作用，但可能会引起血小板减少症，皮炎和粘膜炎。

作为另一实例，15 - 脱氧精胍菌素是一种 Nippon-Kayaku 产化合物，主要影响单核细胞/巨噬细胞的功能，包括抑制氧化代谢，溶酶体酶合成，IL

- 1 生产和 MHC II 型抗原的细胞表面表达。在难治的肾排斥中有 70 - 90 % 的效力，但在高剂量时可能会发生骨髓毒性。

作为另一实例，来福米物 (leflunomide) 是抑制细胞因子作用，阻断 T 细胞激活以及抗体合成的 Hoechst 化合物。它对肾和骨髓没有毒性。

5 作为另一实例，雷怕霉素 (rapamycin) 是与 FK506 有关的 Wyeth-Ayerst 化合物。它是必须与一种免疫亲和蛋白结合才有活性并不抑制神经钙蛋白或阻断 T 细胞细胞因子生产的前药物。借助未知的机制，雷怕霉素阻断 G1 到 S 转运。

10 在上述举证性实施例中所列的大量修饰和变化对于本领域专业人员来说是可预期的。结果只应将权利要求中的限制放在本发明上。

序列表

(1) 一般资料

- (i) 申请人: Lockerbie, Robert Owen, et al.
- (ii) 发明题目: 神经钙蛋白抑制化合物和固定蛋白
- (iii) 序列数: 42

15

(iv) 相关地址:

- (A) 收件人: Marshall, O' Toole, Gerstein, Murray & Borun
- (B) 街道: 233 South Wacker Drive, 6300 Sears Tower
- (C) 城市: Chicago
- (D) 州: Illinois
- (E) 国家: United States of America
- (F) 邮编: 60606

20

(v) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容
- (C) 操作系统: PC-DOS / MS-DOS
- (D) 软件: atent In Release # 1.0, Version #1.25

25

(vi) 目前申请数据:

- (A) 申请号:
- (B) 申请日:
- (C) 分类号:

30

(vii) 在先申请资料:

- (A) 申请号: US 08 / 404, 731
- (B) 申请日: 15 / 5, 1995

(vii) 在先申请资料:

- (A) 申请号: US 08 / 344, 227
- (B) 申请日: 23 / 11, 1995

(viii) 代理人/代理资料

- (A) 姓名: Williams Jr., Joseph A.
- (B) 登记号: 38, 659
- (C) 文献/档案号: 27866/32861

35

- (ix) 通讯资料:
(A) 电话: 312-474-6300
(B) 电传: 312-4740448

(2) SEQ ID NO: 1 的资料:

- 5 (i) 序列特征:
(A) 长度: 13 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽
10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 2 的资料:

- 15 (i) 序列特征:
(A) 长度: 15 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

20 Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro Leu Gln
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 3 的资料:

- 25 (i) 序列特征:
(A) 长度: 15 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性
(ii) 分子类型: 肽
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

30 Arg Arg Lys Arg Ser Gln Ser Ser Lys Glu Glu Lys Pro Phe Lys
1 5 10 15

(2) SEQ ID NO: 4 的资料:

- 35 (i) 序列特征:
(A) 长度: 24 个氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

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

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Ala
20

(2) SEQ ID NO: 5 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

Gly Arg Arg Asn Ala Ile His Asp Ile
1 5

(2) SEQ ID NO: 6 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 2257 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: CDS

(B) 位置: 1..1461

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

CCG CCC CCG CCC CCG CCC CCA CCG CCC CCT CTC GGG GCC GAC CGC GTC
48
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Asp Arg Val
1 5 10 15

GTC AAA GCT GTT CCT TTT CCC CCA ACT CAT CGG CTG ACA TCT GAA GAA
96
Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Thr His Arg Leu Thr Ser Glu Glu
20 25 30

GTG TTT GAT ATG GAT GGG ATA CCC AGG GTT GAT GTT CTG AAG AAC CAC
144
Val Phe Asp Met Asp Gly Ile Pro Arg Val Asp Val Leu Lys Asn His
35 40 45

TTG GTA AAA GAA GGG CGG GTG GAT GAA GAA ATT GCA CTA AGA ATT ATC
 192
 Leu Val Lys Glu Gly Arg Val Asp Glu Glu Ile Ala Leu Arg Ile Ile
 50 55 60
 5 AAT GAG GGT GCT GCC ATA CTT CGG CGG GAG AAA ACC ATG ATA GAA GTA
 240
 Asn Glu Gly Ala Ala Ile Leu Arg Arg Glu Lys Thr Met Ile Glu Val
 65 70 75 80
 GAA GCT CCA ATT ACA GTG TGT GGT GAC ATC CAT GGC CAA TTT TTT GAT
 288
 10 Glu Ala Pro Ile Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe Asp
 85 90 95
 CTG ATG AAA CTT TTT GAA GTA GGA GGA TCA CCT GCT AAT ACA CGA TAC
 336
 Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg Tyr
 15 100 105 110
 CTT TTT CTT GGT GAT TAT GTG GAC AGA GGT TAT TTT AGT ATA GAG TGT
 384
 Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu Cys
 115 120 125
 20 GTC TTA TAT TTA TGG GTC TTG AAG ATT CTA TAC CCA AGC ACA TTA TTC
 432
 Val Leu Tyr Leu Trp Val Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Ser Thr Leu Phe
 130 135 140
 CTT CTG AGA GGC AAC CAT GAA TGC AGA CAC CTT ACT GAA TAT TTT ACC
 480
 25 Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe Thr
 145 150 155 160
 TTT AAG CAG GAA TGT AAA ATT AAA TAT TCA GAA AGA GTC TAT GAA GCT
 528
 30 Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Glu Ala
 165 170 175
 TGT ATG GAG GCT TTT GAC AGC TTG CCC CTT GCT GCA CTT CTA AAC CAA
 576
 Cys Met Glu Ala Phe Asp Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Leu Asn Gln
 35 180 185 190

CAA TTT CTT TGT GTT CAT GGT GGA CTT TCA CCA GAA ATA CAC ACA CTG
 624
 Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile His Thr Leu
 195 200 205
 5
 GAT GAT ATT AGG AGA TTA GAT AGA TTT AAA GAG CCA CCT GCA TTT GGA
 672
 Asp Asp Ile Arg Arg Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Phe Gly
 210 215 220
 10
 CCA ATG TGT GAC TTG CTA TGG TCT GAT CCT TCT GAA GAC TTT GGA AAT
 720
 Pro Met Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Ser Glu Asp Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 15
 GAA AAA TCA CAA GAA CAT TTT AGT CAT AAT ACA GTT CGA GGA TGT TCT
 768
 Glu Lys Ser Gln Glu His Phe Ser His Asn Thr Val Arg Gly Cys Ser
 245 250 255
 20
 TAT TTT TAT AAC TAT CCA GCA GTG TGT GAA TTT TTG CAA AAC AAT AAT
 816
 Tyr Phe Tyr Asn Tyr Pro Ala Val Cys Glu Phe Leu Gln Asn Asn Asn
 260 265 270
 25
 TTG TTA TCG ATT ATT AGA GCT CAT GAA GCT CAA GAT GCA GGC TAT AGA
 864
 Leu Leu Ser Ile Ile Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr Arg
 275 280 285
 30
 ATG TAC AGA AAA AGT CAA ACT ACA GGG TTT CCT TCA TTA ATA ACA ATT
 912
 Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr Ile
 290 295 300
 35
 TTT TCG GCA CCT AAT TAC TTA GAT GTC TAC AAT AAT AAA GCT GCT GTA
 960
 Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Val
 305 310 315 320
 CTA AAG TAT GAA AAT AAT GTG ATG AAC ATT CGA CAG TTT AAT TGC TCT
 1008
 Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys Ser

					325					330					335	
	CCA	CAT	CCT	TAT	TGG	TTG	CCC	AAT	TTT	ATG	GAT	GTC	TTT	ACA	TGG	TCC
5		1056														
	Pro	His	Pro	Tyr	Trp	Leu	Pro	Asn	Phe	Met	Asp	Val	Phe	Thr	Trp	Ser
					340					345					350	
	TTA	CCA	TTT	GTT	GGA	GAA	AAA	GTG	ACA	GAA	ATG	TTG	GTA	AAT	GTT	CTG
		1104														
10	Leu	Pro	Phe	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Glu	Met	Leu	Val	Asn	Val	Leu
					355					360					365	
	AGT	ATT	TGT	TCT	GAT	GAT	GAA	CTA	ATG	ACA	GAA	GGT	GAA	GAC	CAG	TTT
		1152														
	Ser	Ile	Cys	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Glu	Gly	Glu	Asp	Gln	Phe
					370					375					380	
15	GAT	GTA	GGT	TCA	GCT	GCA	GCC	CGG	AAA	GAA	ATC	ATA	AGA	AAC	AAG	ATC
		1200														
	Asp	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	Ile	Ile	Arg	Asn	Lys	Ile
					385					390					395	400
20	CGA	GCA	ATT	GGC	AAG	ATG	GCA	AGA	GTC	TTC	TCT	GTT	CTC	AGG	GAG	GAG
		1248														
	Arg	Ala	Ile	Gly	Lys	Met	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Val	Leu	Arg	Glu	Glu
					405					410					415	
25	AGT	GAA	AGC	GTG	CTG	ACA	CTC	AAG	GGC	CTG	ACT	CCC	ACA	GGG	ATG	TTG
		1296														
	Ser	Glu	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Pro	Thr	Gly	Met	Leu
					420					425					430	
30	CCT	AGT	GGA	GTG	TTG	GCT	GGA	GGA	CGG	CAG	ACC	TTG	CAA	AGT	GGT	AAT
		1344														
	Pro	Ser	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Gly	Arg	Gln	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
					435					440					445	
35	GAT	GTT	ATG	CAA	CTT	GCT	GTG	CCT	CAG	ATG	GAC	TGG	GGC	ACA	ACT	CAC
		1392														
	Asp	Val	Met	Gln	Leu	Ala	Val	Pro	Gln	Met	Asp	Trp	Gly	Thr	Thr	His
					450					455					460	

5

TCT TTT GCT AAC AAT ACA CAT AAT GCA TGC AGG GAA CTC CTT CTG CTT
 1440
 Ser Phe Ala Asn Asn Thr His Asn Ala Cys Arg Glu Leu Leu Leu Leu
 465 470 475 480

TTT AGT TCC TGT CTT AGC AGC TGACATATGC AGGGTATTAT GTGATAGGCA
 1491
 Phe Ser Ser Cys Leu Ser Ser
 485

10

TCTGATTAGT ACCTGCCAG GGCATAATAT TGATAGAACA AGTTGTCTTT TAACTGAAAA
 1551

TAACAATCAG TTTCCAGAT TTTCATAAGG TGATATGGGG AGCAGCTCAT GTCATAATTC
 1611

CGAAATATTT ATTCATTTGT TTAATGCACC CCTTTCTTTC AAAAGCCTCA GTCAAGAATG
 1671

15

TGAATCAGGG ATATATCTAT ATATCTATTT ACACACATAC ATAAATATAT ATAACATAAAA
 1731

TGGAAATGTA ATTCCGAGTT TCTTACTTTT AAAATTTACG TAATTGTATT AGATTTTGCT
 1791

TATGTTTTCA AGTATTTATT TTTTGAGTTA AAATTCTGCT TAGGCCCCAA AACTTCCTTT
 1851

20

ATGCACTCAT TTGCCAAAAG ATTTATGCTA AATTTTGTTAC CCTGGTAAAT GATTAGAGTT
 1911

TGTTTTCTGT GGTGTTTGTC AAACGTTCTA TGTATAATG ACTGTCTGTA ACATGCTGTT
 1971

TCCTTCCTCT GCAGATATAG CTGCTTTCCT AAATCTGTCT GTCTTTCTTT AGGATAGCTG
 2031

25

TATGTCTGTA AATATATGTT CAATTAAATT ACTCTATCAG ACGCTTGTCT GTCTTTTGAT
 2091

GTAGAAGCAA CTTTGTAGCA CCTTGATTTT AGGTTTGCTG CATTGTGTTGC TGCACTTGGT
 2151

TCAGTCTGAA TATGAATGTA ACATTAGATA TTGAGCTATT GTTATAAAGG GTTGAATTTA
 2211

30

AATCATGTAA GTCAAAATTG AAAGGGTGTT ATAAAGTGTG CCTTTA
 2257

(2) SEQ ID NO: 7 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 487 个氨基酸.

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

35

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

5

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Asp Arg Val
1 5 10 15

Val Lys Ala Val Pro Phe Pro Pro Thr His Arg Leu Thr Ser Glu Glu
20 25 30

10

Val Phe Asp Met Asp Gly Ile Pro Arg Val Asp Val Leu Lys Asn His
35 40 45

Leu Val Lys Glu Gly Arg Val Asp Glu Glu Ile Ala Leu Arg Ile Ile
50 55 60

Asn Glu Gly Ala Ala Ile Leu Arg Arg Glu Lys Thr Met Ile Glu Val
65 70 75 80

15

Glu Ala Pro Ile Thr Val Cys Gly Asp Ile His Gly Gln Phe Phe Asp
85 90 95

Leu Met Lys Leu Phe Glu Val Gly Gly Ser Pro Ala Asn Thr Arg Tyr
100 105 110

20

Leu Phe Leu Gly Asp Tyr Val Asp Arg Gly Tyr Phe Ser Ile Glu Cys
115 120 125

Val Leu Tyr Leu Trp Val Leu Lys Ile Leu Tyr Pro Ser Thr Leu Phe
130 135 140

25

Leu Leu Arg Gly Asn His Glu Cys Arg His Leu Thr Glu Tyr Phe Thr
145 150 155 160

Phe Lys Gln Glu Cys Lys Ile Lys Tyr Ser Glu Arg Val Tyr Glu Ala
165 170 175

Cys Met Glu Ala Phe Asp Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Leu Asn Gln
180 185 190

30

Gln Phe Leu Cys Val His Gly Gly Leu Ser Pro Glu Ile His Thr Leu
195 200 205

Asp Asp Ile Arg Arg Leu Asp Arg Phe Lys Glu Pro Pro Ala Phe Gly
210 215 220

35

Pro Met Cys Asp Leu Leu Trp Ser Asp Pro Ser Glu Asp Phe Gly Asn
225 230 235 240

Glu Lys Ser Gln Glu His Phe Ser His Asn Thr Val Arg Gly Cys Ser
245 250 255

5

Tyr Phe Tyr Asn Tyr Pro Ala Val Cys Glu Phe Leu Gln Asn Asn Asn
260 265 270

Leu Leu Ser Ile Ile Arg Ala His Glu Ala Gln Asp Ala Gly Tyr Arg
275 280 285

10

Met Tyr Arg Lys Ser Gln Thr Thr Gly Phe Pro Ser Leu Ile Thr Ile
290 295 300

Phe Ser Ala Pro Asn Tyr Leu Asp Val Tyr Asn Asn Lys Ala Ala Val
305 310 315 320

Leu Lys Tyr Glu Asn Asn Val Met Asn Ile Arg Gln Phe Asn Cys Ser
325 330 335

15

Pro His Pro Tyr Trp Leu Pro Asn Phe Met Asp Val Phe Thr Trp Ser
340 345 350

Leu Pro Phe Val Gly Glu Lys Val Thr Glu Met Leu Val Asn Val Leu
355 360 365

20

Ser Ile Cys Ser Asp Asp Glu Leu Met Thr Glu Gly Glu Asp Gln Phe
370 375 380

Asp Val Gly Ser Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile
385 390 395 400

25

Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu
405 410 415

Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu
420 425 430

Pro Ser Gly Val Leu Ala Gly Gly Arg Gln Thr Leu Gln Ser Gly Asn
435 440 445

30

Asp Val Met Gln Leu Ala Val Pro Gln Met Asp Trp Gly Thr Thr His
450 455 460

Ser Phe Ala Asn Asn Thr His Asn Ala Cys Arg Glu Leu Leu Leu Leu

35

(2) SEQ ID NO: 11 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 25 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

GTGTGTGTAG ATCTGGTGAA AGTCC
25

(2) SEQ ID NO: 12 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 12:

ATTGTAGAGA TCTAAGTAAT TAGGTGCCG
29

(2) SEQ ID NO: 13 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13:

GCCAATTGCT CAGATCTTGT TTCTTATG
28

(2) SEQ ID NO: 14 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 14:

GGAATTCGGA TCCTCGAGAG ATCTCGCCG

(2) SEQ ID NO: 15 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 15:

CCACTTTGAG ATCTCTACCG TCCTCCAGCC
 30

(2) SEQ ID NO: 16 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 25 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 16:

CCCTGAGATC TTCAGCTGCT AAGAC
 25

(2) SEQ ID NO: 17 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 17:

GGCTGAGATC TGGCAGACCT TGCAAAGTGG
 30

(2) SEQ ID NO: 18 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 32 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18:

GTGATGAAGA TCTTACAGTT TAATTGCTCT CC
32

(2) SEQ ID NO: 19 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 26 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19:

5

10

TTCTCCAGAT CTTGGTAAGG ACCATG
25

(2) SEQ ID NO: 20 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20:

15

20

CACCTTCTGT AGATCTTTCA TCATCAGAAC
30

(2) SEQ ID NO: 21 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 24 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 21:

25

CATCGGCAGA TCTCTGAAGA AGTG
24

(2) SEQ ID NO: 22 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 29 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

30

35

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 22:

CCATGGCCAA TTTTAGATCT CGATGAAAC
29

5

(2) SEQ ID NO: 23 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

10

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23:

GGACCATGAG ATCTAATCCA TAAAATTGGG
30

(2) SEQ ID NO: 24 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24:

AAATGGGAGA TCTAATAAGG ATGTGGAGAG C
31

20

(2) SEQ ID NO: 25 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 32 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25:

GGAGAGCAAT TAAAGATCTA AATGTTTCATC AC
32

30

(2) SEQ ID NO: 26 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

35

- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 26:

TTTTTCATAGA TCTATACAAG CAGCTTT
27

5

(2) SEQ ID NO: 27 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 36 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性

10

- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 27:

CAACCAGATC TAATGTGGAG AGCAATTAAA CTGTCC
36

(2) SEQ ID NO: 28 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 33 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性

15

- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28:

CCAATAAGAG ATCTAAGAGC AATTAAACTG TCG
33

20

(2) SEQ ID NO: 29 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 35 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑结构: 线性

25

- (ii) 分子类型: cDNA
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29:

TGTGAGATCT AATTAAACTG TCGAATGTTT ATCAC
38

30

(2) SEQ ID NO: 30 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 32 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链

35

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

5 GGAGAGCAGA TCTACTGTCG AATGTTTCATC AC
32

(2) SEQ ID NO: 31 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 40 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

AAGGATAGAT CTAGCAATTA AACTGTCGAA TGTTTCATCAC
40

15 (2) SEQ ID NO: 32 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 54 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

20 (ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 32:

TACAAC TAGT ACCATGGTCG ATGGTCGACA GATCTCTCGA GAAGCTTAGC TAGC
54

(2) SEQ ID NO: 33 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 981 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 33:

30 CAGAGTATCG ATGAAATCTA CAAATATGAC AAAAAACAAC AACAGAAAT CCTGGCGGCG
60

AAACCCTGGA CTAAGGATCA CCACTACTTT AAATACTGCA AAATCTCAGC ATTGGCTCTA
120

CTGAAAATGG TGATGCATGC CAGGTCAGGA GGCAACTTGG AAGTGATGGG TTTGATGCTC
35

180

GGGAAAGTCG ACGGCGAGAC CATGATCATC ATGGACAGTT TCGCTTTGAC TG TAGAGGGC
240

5

ACAGAAACTC GAGTAAATGC TCAAGCTGCT GCGTATGAGT ATATGGCTGC ATACATAGAA
300

AATGCCAAAC AGGTTGGCCG CCTTGAGAAT GCAATCGGTT GGTATCATAG CCACCCTGGT
360

TATGGCTGCT GGCTCTCCGG GATTGATGTT AGTACACAGA TGCTGAACCA GCAGTTTCAA
420

10

GAACCATTTG TAGCAGTGGT GATTGATCCA ACCAGAACAA TCTCTGCAGG AAAAGTGAAT
480

CTTGGCGCCT TTAGGACATA TCCAAAGGGC TACAAACCTC CTGATGAAGG ACCTTCTGAG
540

TACCAGACTA TCCCACCTTA ATAAAATAGA AGATTTGGGC GTGCACTGAA ACAATATTAT
600

15

GCCTTAGAAG TCTCATATTT CAAATCATCT TGGATCGTAA ACTACTTGAG CTTTGGTGGA
660

ATAAATACTG GGTGAATACC CTGAGTCCTC TAGCTTGCTT ACTAATGCAG ACTACACCAC
720

AGGCCAGGTG TTGATTTGTC TGAGAAGTTA GAGCAGTCGG AAGCCCAACT GGGACGTGGC
780

20

AGTTTCATGT TGGGCTTAGA AACACATGAC CGCAAGTCGG AAGACAAACT TGCCAAAGCT
840

ACTAGAGACA GCTGTAAAAC CACCATAGAA GCCACCATGG ACTGATGTCT CAGGTTATTA
900

AGGATAAACT GTTAAATCAG ATTAACGTTG TTAGTTACCA CCACGTA CTCAAAGTGG
960

25

TGTGTGGAAG GAAAAGAGCT C
981

(2) SEQ ID NO: 34 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 919 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 34:

30

AAACCCTGGA CTAAGGATCA CCACTACTTT AAATACTGCA AAATCTCAGC ATTGGCTCTA
60

35

CTGAAAATGG TGATGCATGC CAGGTCAGGA GGCAACTTGG AAGTGATGGG TTTGATGCTC
120

GGGAAAAGTCG ACGGGGAGAC CATGATCATC ATGGACAGTT TCGCTTTGCT GTAGAGGGCA
180

5 CAGAAACTCG AGTAAATGCT CAAGCTGCTG CGTATGAGTA TATGGCTGCA TACATAGAAA
240

ATGCCAAACA GGTTGGCCGC CTTGAGAATG CAATCGGTTG GTATCATAGC CACCCTGGTT
300

ATGGCTGCTG GCTCTCCGGG ATTGATGTTA GTACACAGAT GCTGAACCAG CAGTTTCAAG
360

10 AACCATTTGT AGCAGTGGTG ATTGATCCAA CCAGAACAAT CTCTGCAGGA AAAGTGAATC
420

TTGGCGCCTT TAGGACATAT CCAAAGGGCT ACAAACCTCC GATGAAGGAC CTTCTGAGTA
480

CCAGACTATC CCACCTTAAT AAAATAGAAG ATTTGGGCGT GCACTGAAAC AATATTATGC
540

15 CTTAGAAGTC TCATATTTCA AATCATCTTG GATCGTAAAC TACTTGAGCT TTGGTGGAAAT
600

AAATACTGGG TGAATACCCT GAGTCCTCTA GCTTGCTTAC TAATGCAGAC TACACCACAG
660

GCCAGGTGTT GATTTGTCTG AGAAGTTAGA GCAGTCGGAA GCCCAACTGG GACGTGGCAG
720

20 TTTCATGTTG GGCTTAGAAA CACATGACCG CAAGTCGGAA GACAAACTTG CCAAAGCTAC
780

TAGAGACAGC TGTA AAACCA CCATAGAAGC CACCATGGAC TGATGTCTCA GGTTATTAAG
840

GATAAACTGT TTAATCAGAT TAACGTTGTT AGTTACCACC ACGTACTTCT CAAAGTGGTG
900

25 TGTGGAAGGA AAAGAGCTC
919

(2) SEQ ID NO: 35 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 541 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 35:

35 GACCACCGAG ATGCCAATTC CAGTGTCATG AGATTTCTGC GAGACCTCAT CCACACAGGA

60

GTAGCCAATG ATTTATCTGT TTTCTTACAG CATGAAGAAG ATTTTGTTC GGAAGGAACT
120

5

AATTGGACAG GTGATGAGCC AGCTTGGGCA GCAACTTGTC AGCCAGCTGC TCCACACATG
180

CTGCTTTTGG TTCCCCCTA CACCCTACCC GACGTGGTTG AAGTGCTCTG GGAGATCATG
240

CAGGTTGACA GACCGACTTT CTGTCGGTGG CTAGAGAATT CCTTGAAAGG TTTGCCAAAA
300

10

GAGACCACAG TGGGAGCTGT CACAGTGACA CATAAACAAC TTACAGATTT CCACAAGCAA
360

GTCAGTAGTG CCGAGGAATG TAAGCAAGTT TGCTGGGCCT TGAGAGACTT CACCAGGTTG
420

TTTCGATAGC TCAAGCTCAC ACTCCTGCAC TGTGCCTGTC ATCCAGGAAT GTCTTTTTTT
480

15

ATTAGAAGAC AGGAAGAAAA CAACCCAGAC TGTGTCCCAC AATCAGAAAC CTCTGTTGTG
540

G

541

(2) SEQ ID NO: 36 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 519 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 36:

20

CGAGATGCCA ATTCCAGTGT CATGAGATTT CTGCGAGACC TCATCCACAC AGGAGTAGCC
60

AATGATCATG AAGAAGATTT TGAATTGCGG AAGGAACTAA TTGGACAGGT GATGAGCCAG
120

CTTGGCCAGC AACTTGTGAG CCAGCTGCTC CACACATGCT GCTTTTGTCT TCCCCCTACA
180

30

CCCTACCCGA CGTGGTTGAA GTGCTCTGGG AGATCATGCA GGTTGACAGA CCGACTTTCT
240

GTCGGTGGCT AGAGAATTCC TTGAAAGGTT TGCCAAAAGA GACCACAGTG GGAGCTGTCA
300

CAGTGACACA TAAACAACCTT ACAGATTTCC ACAAGCAAGT CACTAGTGCC GAGGAATGTA
360

35

AGCAAGTTTG CTGGGCCTTG AGAGACTTCA CCAGGTTGTT TCGATAGCTC AAGCTCACAC
420

TCCTGCACTG TGCCTGTCAT CCAGGAATGT CTTTTTTTAT TAGAAGACAG GAAGAAAACA
480

5

ACCCAGACTG TGTCCACAA TCAGAAACCT CTGTTGTGG
519

(2) SEQ ID NO: 37 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 37:

Phe Xaa Arg Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
1 5 10

10

(2) SEQ ID NO: 38 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 38:

Phe Ala Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
1 5 10

20

(2) SEQ ID NO: 39 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 39:

25

Phe Lys Arg Ala Ala Ala Ala Lys Ala Leu Ala Pro Lys
1 5 10

30

(2) SEQ ID NO: 40 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 14 个氨基酸

35

说明书附图

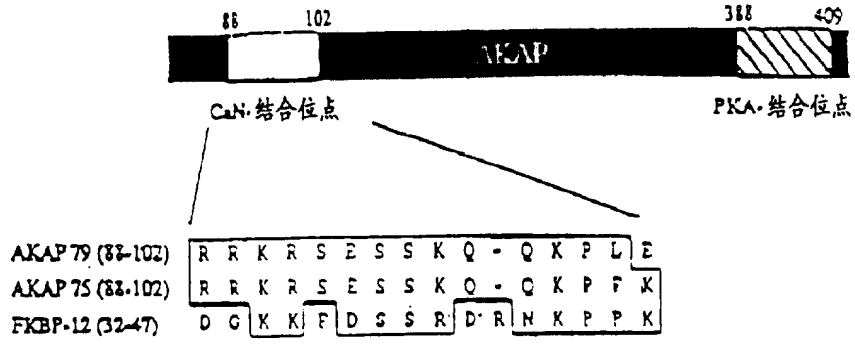


图 1A

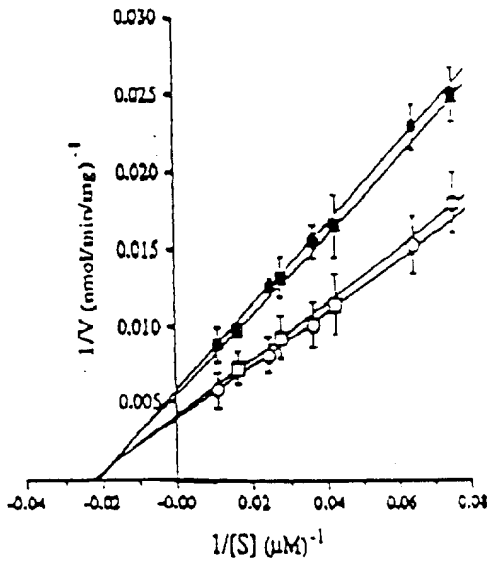


图 1B

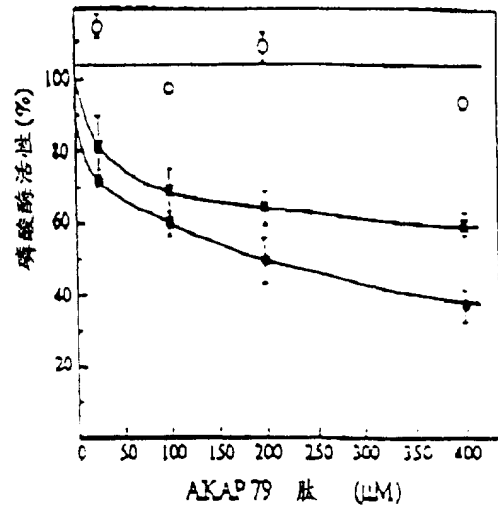


图 1C

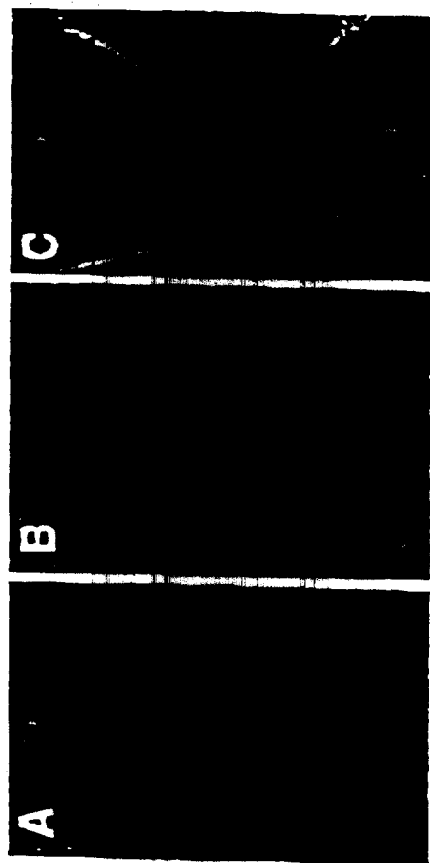


图 2

Mu	克隆 11.1		----- P P P P P P P P P P G A D R V V K A V P F P P T E R L T S E E V F D P G G I P	40
Hu	神经钙蛋白	A1	M A A P E P A R A A P P P P P P P P P P G A D R V V K A V P F P P T E R L T S E E V F D P G G I P	50
Mu	克隆 11.1		R V D V L K N E L V K E G R V D E E L A L R I N E G A A I L R R E K T M I E V E A P I T V C G D I	90
Hu	神经钙蛋白	A1	R V D V L K N E L V K E G R V D E E L A L R I N E G A A I L R R E K T M I E V E A P I T V C G D I	100
Mu	克隆 11.1		E G O F F D L M K L F E V G G S P A N T R Y L F L G D Y V D R G Y F S I E P V L -----	130
Hu	神经钙蛋白	A1	E G O F F D L M K L F E V G G S P A N T R Y L F L G D Y V D R G Y F S I E P V L G T E D I S I N P E	150
Mu	克隆 11.1		----- L W L K I L Y P S T L F L L R G N H E C R E L T E Y F T T K Q E C K I K Y S E R	172
Hu	神经钙蛋白	A1	N N I N E C V L L W L K I L Y P S T L F L L R G N H E C R E L T E Y F T T K Q E C K I K Y S E R	200
Mu	克隆 11.1		V Y E A C M E A F D S I P L A A L L N Q Q F L C V E G G L S P E I E T L D D I R R L D R F K E P P A	222
Hu	神经钙蛋白	A1	V Y E A C M E A F D S I P L A A L L N Q Q F L C V E G G L S P E I E T L D D I R R L D R F K E P P A	250
Mu	克隆 11.1		F G P M C D L L W S D P S E D F G N E K S Q E E F S E N T V R C C S Y F Y N P A V C E F L Q N N S	272
Hu	神经钙蛋白	A1	F G P M C D L L W S D P S E D F G N E K S Q E E F S E N T V R C C S Y F Y N P A V C E F L Q N N S	300
Mu	克隆 11.1		L L S I I R A H E A Q D A G Y R M Y R K S Q T T G F P S L I T I F S A P N Y L D V Y N N K A A V L K	322
Hu	克隆	A1	L L S I I R A H E A Q D A G Y R M Y R K S Q T T G F P S L I T I F S A P N Y L D V Y N N K A A V L K	350
Mu	克隆 11.1		M E N N V M N I R Q F N C S P E P Y W L P N F M D V T T W S L P F V G E K V T E M L V N V L S I C S	372
Hu	神经钙蛋白	A1	M E N N V M N I R Q F N C S P E P Y W L P N F M D V T T W S L P F V G E K V T E M L V N V L S I C S	400
Mu	克隆 11.1		D D E L M T E G E D Q F D G S A A A R K E I T R N K I R A I G R M A R V F S V L R E E S E S V L T	422
Hu	神经钙蛋白	A1	D D E L M T E G E D Q F D G S A A A R K E I T R N K I R A I G R M A R V F S V L R E E S E S V L T	449
Mu	克隆 11.1		L K G L I P T G R L P S G V L A G G R Q T L Q S G N D V M Q L A V P O M D W G T H E S F A N N E E N	472
Hu	神经钙蛋白	A1	L K G L I P T G R L P S G V L A G G R Q T L Q S G N D V M Q L A V P O M D W G T H E S F A N N E E N	499
Mu	克隆 11.1		A C R E F L L E F S S C L S S	487
Hu	神经钙蛋白	A1	A C R E F L L E F S S C L S S	514

图 3

二萜衍生物/IBMX 在 JURKAT
T 细胞中诱导的 cAMP 产生

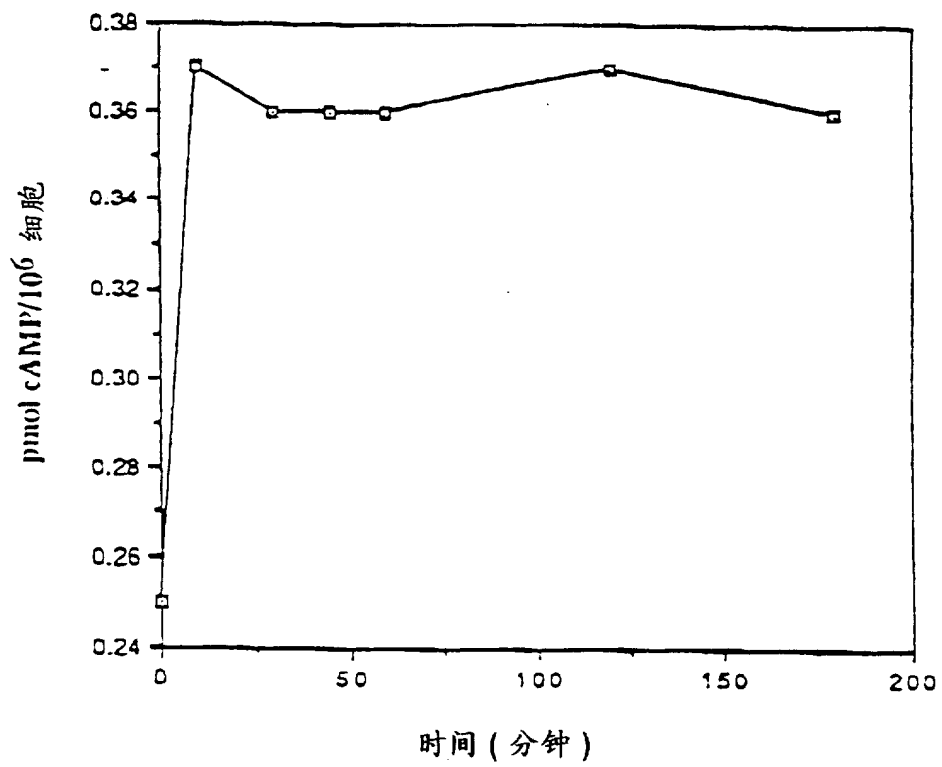


图 4

