

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823700.8

[51] Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006年2月15日

[11] 公开号 CN 1735687A

[22] 申请日 2003.8.1 [21] 申请号 03823700.8

[30] 优先权

[32] 2002.8.2 [33] US [31] 60/400,044

[86] 国际申请 PCT/US2003/023981 2003.8.1

[87] 国际公布 WO2004/012660 英 2004.2.12

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.4

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 L·-L·林 Y·M·彦诺尼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 王景朝

权利要求书 5 页 说明书 40 页 序列表 19 页
附图 20 页

[54] 发明名称

MK2 相互作用蛋白

[57] 摘要

本发明涉及能结合 MK2 以调节炎症的蛋白的应用。更具体地,本发明涉及能结合 MK2 以治疗与炎症相关的状况的蛋白的应用。本发明可以用于治疗炎症性状况,更具体地,用于治疗其中炎症的减少是治疗上有益的状况。

1. 一种分离的、纯化的或重组的蛋白复合物，其包含：
 - (i) MK2 多肽；和
 - (ii) 选自 STS、HPH2 和 Shc 的 MK2 相互作用蛋白。
- 5 2. 如权利要求 1 的复合物，其包含 MK2 多肽和至少一种 MK2 相互作用蛋白。
3. 如权利要求 2 的复合物，其中所述的 MK2 相互作用蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。
4. 如权利要求 1 的复合物，其包含 MK2 多肽和至少两种 MK2 相互
10 作用蛋白。
5. 如权利要求 4 的复合物，其中所述的 MK2 相互作用蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。
6. 如权利要求 1 的复合物，其中所述的 MK2 多肽包含融合蛋白。
7. 如权利要求 6 的复合物，其中所述的融合蛋白包含用于纯化、
15 分离或检测融合蛋白的域。
8. 如权利要求 6 的复合物，其中所述的融合蛋白包含的域选自：
亲和力标记、放射性核苷酸、酶和荧光团。
9. 如权利要求 7 的复合物，其中所述的域选自：聚组氨酸、FLAG、
Glu-Glu、谷胱甘肽 S 转移酶 (GST)、硫氧还蛋白、蛋白 A、蛋白 G 和
20 免疫球蛋白重链恒定区。
10. 包含第一核酸和第二核酸的宿主细胞，其中第一核酸编码重组 MK2 多肽，第二核酸编码选自 STS、HPH2 和 Shc 的 MK2 相互作用蛋白。
11. 如权利要求 10 的细胞，还包含第三核酸，它编码第二种选自
25 STS、HPH2 和 Shc 的 MK2 相互作用蛋白。
12. 确定受检化合物抑制或促进蛋白复合物形成的测定，其包括：
 - (a) 形成反应混合物，它包含 MK2 多肽、至少一种 MK2 相互作用蛋白和受检化合物；和
 - (b) 检测 MK2 和 MK2 相互作用蛋白之间的蛋白复合物的存在；
30 其中在有受检化合物存在的情况下的复合物的量相对于在没有受检化合物存在的情况下的复合物的量的差异指示受检化合物抑制或促进复合物的形成。

13. 如权利要求 12 的测定, 其中在有受检化合物存在的情况下的复合物的量的增加指示受检化合物能促进复合物的形成。

14. 如权利要求 12 的测定, 其中在有受检化合物存在的情况下的复合物的量的减少指示受检化合物能抑制复合物的形成。

5 15. 一种检测受检化合物是否影响 MK2 活性的方法, 其包含:

(a) 形成包含 MK2 多肽和 MK2 相互作用蛋白的蛋白复合物;

(b) 使蛋白复合物与受检化合物接触, 和

(c) 确定受检化合物对选自下组的一种或多种活性的影响: MK2 激酶活性, MK2 在复合物中的量, TNF 的生产和 MK2 底物的磷酸化形式
10 的量。

16. 鉴别能抑制或促进蛋白复合物的形成的筛选测定, 其包括:

(i) 提供双-杂交测定系统, 它包括包含 MK2 多肽的第一融合蛋白和包含选自 STS、HPH2 和 Shc 中的一种或多种的多肽的第二融合蛋白, 在所处的条件下, 两种蛋白在双-杂交测定系统中相互作用;

15 (ii) 测量融合蛋白间在有和没有受检化合物的条件下的相互作用水平; 和

(iii) 对比融合蛋白的相互作用水平,

其中相互作用水平的降低指示能抑制 MK2 多肽和选自 STS、HPH2 和 Shc 中的一种或多种的多肽之间的相互作用的化合物。

20 17. 结合复合物中的一种或多种蛋白的抗体, 所述的复合物包含 MK2 多肽和选自 STS、HPH2 和 Shc 的 MK2 相互作用蛋白。

18. 如权利要求 17 的抗体, 其中所述的抗体抑制 MK2 和 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用。

25 19. 一种调节细胞中的至少包含第一蛋白和第二蛋白的蛋白复合物的形成的方法, 其中第一蛋白是 MK2 多肽, 第二蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc 中的一种或多种, 其中该方法包括给细胞施用能调节复合物形成的化合物。

20. 一种生产复合物的方法, 包含:

30 用一种或多种多核苷酸转染细胞, 所述的多核苷酸编码 MK2 多肽和选自 STS、HPH2 和 Shc 中的一种或多种的 MK2 相互作用蛋白, 其中多肽形成复合物。

21. 一种鉴别抗炎药物的药物筛选方法, 包含:

- a) 提供 MK2 和至少一种 MK2-相互作用蛋白;
b) 使 MK2 和蛋白相互作用, 形成复合物;
c) 向复合物添加有效量的潜在药物; 和
d) 确定潜在药物是否抑制复合物的形成。
- 5 22. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的 MK2 和蛋白在酵母 2-杂交系统中体内地相互作用。
23. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的 MK2 和蛋白在哺乳动物 2-杂交系统中体内地相互作用。
24. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的 MK2 和蛋白体外地相互作用。
- 10 用。
25. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的蛋白是 STS。
26. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的蛋白是 Shc。
27. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的蛋白是 HPH2。
28. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的药物是小分子。
- 15 29. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的药物是肽或蛋白。
30. 如权利要求 21 的方法, 其中所述的药物是抗体。
31. 如权利要求 21 的方法, 药物是化学试剂。
32. 一种调节组织中的炎症的方法, 包含:
- a) 给组织施用核酸, 其中所述的核酸编码 MK2 相互作用蛋白; 和
20 b) 使核酸表达 MK2 相互作用蛋白, 由此调节组织中的炎症。
33. 如权利要求 32 的方法, 其中所述的核酸能表达选自 STS、HPH2 和 Shc 的蛋白。
34. 治疗或预防组织中的炎症的方法, 包括给所述的组织施用治疗有效量的至少一种试剂, 其中所述的试剂:
- 25 a) 阻断 MK2 和 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用; 或
b) 进行相互作用, 但是阻断 MK2 活性。
35. 如权利要求 34 的方法, 其中所述的试剂是抗体。
36. 如权利要求 35 的方法, 其中所述的抗体是多克隆抗体。
37. 如权利要求 35 的方法, 其中所述的抗体是单克隆抗体。
- 30 37. 如权利要求 35-37 的方法, 其中所述的抗体结合 MK2。
38. 如权利要求 35-37 的方法, 其中所述的抗体结合 MK2-相互作用蛋白。

39. 如权利要求 34 的方法, 其中所述的试剂是化学试剂。
40. 如权利要求 34 的方法, 其中所述的试剂是肽或蛋白。
41. 如权利要求 34 的方法, 其中所述的试剂是小分子。
42. 一种调节组织中的炎症的方法, 包含:
- 5 a) 使组织与至少一种结合 MK2 的蛋白接触; 和
- b) 使蛋白调节组织中的炎症。
43. 一种治疗患有至少一种炎症状况的患者的方法, 包含:
- a) 施用治疗有效剂量的至少一种化合物, 它选自与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物, 其中所述的化合物选自抗体、
- 10 化学试剂、小分子、蛋白和肽; 和
- b) 使化合物结合到 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种, 并调节炎症。
44. 如权利要求 43 的方法, 其中所述的蛋白或肽是刺激 MK2 活性的野生型蛋白或肽的突变体形式。
- 15 45. 如权利要求 43 的方法, 其中所述的蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。
46. 如权利要求 43 的方法, 其中所述的状况选自克隆氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、迟发型过敏反应、哮喘、系统性红斑狼疮和由于创伤或损伤引起的炎症。
- 20 47. 一种在细胞中表达核酸以抑制炎症的方法, 包含:
- a) 加入编码化合物的至少一种核酸, 所述的化合物选自能与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物, 其中所述的化合物选自抗体、化学试剂、小分子、蛋白和肽; 和
- 25 b) 使细胞表达化合物并抑制炎症。
48. 如权利要求 47 的方法, 其中所述的核酸编码选自 STS、HPH2 和 Shc 的蛋白。
49. 检测样品中不存在 MK2、存在 MK2 和 MK2 量中的至少一种的方法, 包含:
- 30 a) 施用至少一种化合物, 它与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用, 其中所述的化合物选自抗体、化学试剂、小分子、蛋白和肽; 和

b) 将不存在、存在结合的蛋白或化合物或其量与样品中不存在 MK2、存在 MK2 或 MK2 的量相关联。

50. 如权利要求 49 的方法，其中所述的蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。

5 51. 一种试剂盒，其中所述的试剂盒能定量检测 MK2，该试剂盒包含与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物，其中所述的化合物选自抗体、化学试剂、小分子、蛋白和肽；和至少一种其它试剂盒组分，它选自：

a) 缓冲剂和溶液中的至少一种；

10 b) 至少一种结构组分。

52. 如权利要求 51 的试剂盒，还包含结合蛋白或化合物的试剂。

53. 如权利要求 52 的试剂盒，其中所述的试剂是抗体。

54. 如权利要求 51 的试剂盒，其中所述的蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。

15 55. 一种药物组合物，它包含：

a) 至少一种结合 MK2 的蛋白，和

b) 至少一种药学上可接受的载体。

56. 如权利要求 55 的组合物，其中所述的蛋白选自 STS、HPH2 和 Shc。

MK2 相互作用蛋白

相关申请

5 本发明享有美国临时专利申请系列号 60/400,044 的优先权的益处。

技术领域

本发明涉及结合 MAPKAP 激酶 2 (MK2) 的蛋白的应用。更具体地, 本发明涉及结合 MK2、用于治疗与炎症相关的状况的蛋白的应用。本发
10 明可以用于治疗状况, 例如克隆氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、迟发型过敏反应、哮喘、系统性红斑狼疮和由于创伤或损伤引起的炎症。

背景技术

许多人和动物状况与炎症相关。迄今为止, 对这些状况几乎没有
15 可靠的或有效的治疗方法。但是, 通过给患有这些状况的患者采用能够减轻炎症的治疗方法, 可以基本上减轻与这些状况相关的可怕症状。尽管这些状况尚未治愈, 这样的疗法能显著地提高这些患者的生活质量, 改善这些状况的一些影响。这样, 本领域需要鉴别出新的有助于完全消除患有这些状况的患者的炎症的治疗方法。

20 炎症状况经常与不当的细胞因子调节相关 (Han 等, Nature Cell Biol., E39-E40 (1999))。鉴于该原因, 炎性细胞因子表达的选择性抑制剂成为治疗与炎症相关的状况的潜在药物。

认为 MAPKAP 激酶 2 (MK2) 有助于调节几种细胞因子, 因此可以成为炎性反应的基本组分。MK2 无效突变的小鼠表现出增强的对脂多糖诱导的内毒素休克的抗性 (Kotlyrov 等, Nature Cell Biol., 1: 94-
25 97 (1999))。认为这种应激抗性的原因是几种炎性细胞因子 (包括 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 IFN- γ) 的生物合成的减少。因为 MK2 在调节炎性细胞因子中的作用, 能够结合并抑制 MK2 活性的蛋白成为减少炎症的潜在药物。

30 已经证实 MK2 与许多蛋白相关。作为对某些环境刺激或炎性细胞因子的反应, MK2 被 p38 MAP 激酶磷酸化 (Kotlyarov 等, Nature Cell Biology, 1: 94-97 (1999)), 如图 7 所示。MK2 磷酸化血清反应因

子(SRF) (Heidenreich 等, J. Biol. Chem., 274: 14434-14443 (1999))、CREB 和 ER81 (Janknecht, J. Biol. Chem. , 276: 41856-41861 (2001))小热休克蛋白和淋巴细胞特异性蛋白 1 (综述于,Neininger 等, EMBO Reports, 2: 703-708 (2001))、E47 (Neufeld 5 等, J. Biol. Chem. , 275: 20239-20242 (2000))、Akt (Rane 等, J. Biol. Chem. , 276: 3517-3523 (2001))、酪氨酸羟化酶和 TTP (Mahtani 等, Mol. Cell Biol., 21: 6461-6469 (2001))。另外, MK2 与 5-脂氧化酶相互作用, 该酶能催化合成白三烯(它们是一组炎症介质)的重要步骤(Janknecht, J. Biol. Chem. 276: 10 41856-41861 (2001))。但是, 已经证实蛋白 hnRNP A0 在 MK2 +/+ 和 -/- 细胞中受到不同的调节。

这样, 由于 MK2 参与炎症反应, 它可以成为治疗性干预的理想的目标。更具体地, 能抑制 MK2 活性的治疗剂可以用于治疗人或动物的状况, 其中减轻炎症是治疗上有益的。

15 发明内容

因此, 本发明涉及与 MK2 相互作用的蛋白。结合 MK2 的蛋白, 包括这样的蛋白的剪接变体、截短物、片段、取代、添加和缺失突变体、融合蛋白、改组突变体、基序序列和同源物, 是潜在的新型抗炎药物试剂。

20 本发明还涉及包含 MK2 和 MK2 相互作用蛋白(例如 STS、HPH2 和 Shc 以及它们的变体)的蛋白复合物。其它的 MK2 相互作用蛋白的实例包括 SRF、CREB、ER81、酪氨酸羟化酶、TTP、小热休克蛋白 1、E47、Akt 和 5-脂氧化酶。这些蛋白中的一种或多种也可以存在于包括 MK2 的蛋白复合物中。本发明还提供了制备和使用这样的蛋白复合物的方法, 该方法用于鉴别潜在的用于治疗其中需要调节炎症的状况和疾病的化合物。

本发明提供了调节表达 MK2 的细胞中的炎症活性的方法。该方法包括施用有效量的结合 MK2 的蛋白。本发明还包括通过施用编码至少一种结合 MK2 的蛋白的 DNA 分子在细胞中表达蛋白的方法。

30 本发明还包括鉴别抗炎药物的药物筛选方法。在一些实施方案中, 抗炎药物通过这样的方法鉴别, 它包括, 例如, 提供包含 MK2 和至少一种 MK2 相互作用蛋白的复合物, 向复合物加入有效量的受检化

合物并确定受检化合物是否抑制 MK2 与相互作用蛋白的相互作用。根据本发明的方法鉴别出的抗炎药物包括能抑制 MK2 与 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用的小分子、化学试剂、蛋白、肽和抗体。另外，本发明还提供了鉴别潜在的抗炎药物的方法，该药物允许 MK2 与至少一种 MK2 相互作用蛋白发生相互作用，但是会阻断 MK2 活性。抗炎药物的实例包括小分子、化学试剂、蛋白、肽和抗体。

5 根据本发明，为了治疗或预防其中减少炎症会是治疗上有益的状况，可以给患者施用治疗有效剂量的与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用并调节 MK2 活性的化合物（例如蛋白、肽、抗体、化学试剂和小分子）。实施方案包括治疗包括与炎症增加有关的细胞和组织的状况。

与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物可以包括在药物制剂中。该药物制剂可以含有其它的组分，例如辅助将化合物结合到 MK2 或 MK2 复合物的试剂。

15 另外，与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物可以用作定量地或定性地检测 MK2 的诊断工具。例如，这些化合物可以是放射性标记的，组织可以与这些标记的蛋白一起孵育，多余的未结合的蛋白可以洗去。然后可以确定组织存在放射活性，这表明存在 MK2。与至少一种 MK2 或 MK2 复合物相互作用的化合物可以用于检测 MK2 在细胞、体液、组织或器官中是否存在或其量。检测到的 MK2 存在或其量可以与一种或多种这里列出的医学状况相关联。

20 本发明还包括能促进 MK2 与 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用的化合物，其中 MK2 相互作用蛋白刺激导致炎性反应的 MK2 活性。这样的试剂在治疗其中需要刺激 MK2 并且随后增加 TNF- α 生成的状况（例如单核细胞增生利斯特氏菌感染）中特别有用。

25 因此，本发明还包括用于检测样品中的 MK2 水平的试剂盒，它包含至少一种与 MK2 或 MK2 复合物相互作用的化合物，无论它是否被标记，和至少一种结合该化合物的试剂，例如标记的抗体。该试剂盒还可以包含适当的生物标准和对照样品，它们可以用来比较实验检测的结果。它还可以包含缓冲液或洗涤液和关于使用试剂盒的说明书。还可以包括在其上面可以进行实验的结构部件，例如棒、珠、纸、柱、小瓶或凝胶。

附图说明

图 1A 至 1B 显示了编码“与 smoothelin 相似的”(STS)蛋白的 cDNA 序列, 对应 SEQ ID NO :1。

图 2A 和 2B 显示了编码人多同源异形体 (Polyhomeotic) 2 (HPH2) 蛋白的 cDNA 序列, 对应 SEQ ID NO :2。

图 3A 和 3B 显示了编码 src 同源性和胶原 (Shc) 蛋白的 cDNA 序列, 对应 SEQ ID NO :3。

图 4 显示了“与 smoothelin 相似的”(STS)蛋白的氨基酸序列, 对应 SEQ ID NO :4。

图 5 显示了人多同源异形体 2 (HPH2) 蛋白的氨基酸序列, 对应 SEQ ID NO :5。

图 6 显示了 src 同源性和胶原 (Shc) 蛋白的氨基酸序列, 对应 SEQ ID NO :6。

图 7 显示了 p38/MK2 信号传递途径的图。某些环境刺激或促炎细胞因子会激活 P38 MAP 激酶信号传递途径。MKK3/6 MAP 激酶直接磷酸化 P38。p38 的底物包括转录因子和一些放大和多样化 p38 信号传递的激酶。MK2 激酶是一种 p38 底物, 它可以磷酸化一些蛋白, 包括转录因子、细胞骨架相关蛋白和 RNA 结合蛋白。MK2 还在后转录水平调节 TNF 的生物合成。

图 8 显示了 Shc A、HPH2 和 STS 的结构和 MK2 相互作用域。Shc 的所有三种异构体 (46、52 和 66-kDa) 都含有 src 源性 2 (SH2) 域、磷酸酪氨酸结合 (PTB) 域和胶原蛋白源性域 1 (CH1)。66 kDa 的异构体还含有胶原蛋白源性域 2 (CH2)。人多同源异形体 2 具有不育 α 基序 (SAM) 蛋白相互作用域。STS 含有肌动蛋白结合域 (ABD) 和钙调理蛋白源性域 (CH)。

图 9A 显示了在检测各种 MK2 相互作用蛋白与酵母中的突变 MK2 的相互作用的特异性测定中, 酵母在选择性培养基上的生长和颜色。MK2 相互作用蛋白 Shc、HPH2 和 STS 能结合催化失活的 MK2 K93R 突变体。MK2 相互作用蛋白不结合空 BD 载体 (V) 或核纤层蛋白 (L)。图 9B 总结了从图 9A 的测定得到的数据, 其中 Shc、HPH2 和 STS 中的每一个都能以基本相同的亲和力结合 MK2 和 MK2 K93R。图 9C 显示了 MK2 中的域, 它与 Shc、HPH2 和 STS 相互作用。显示了 MK2 N-端富含脯氨酸的、催

化的和 C-端定位域。

图 10 描述了在有或没有茴香霉素存在的情况下使用 Western 印迹 (WB) 检测的蛋白与 293T 细胞中的 MK2 的共免疫沉淀 (IP)。如图 10A 所示, 使用针对 V5 或 Myc 的抗体的 Western 印迹表明, V5-标记的 Shc 和 Myc-标记的 MK2 蛋白都在 293T 细胞中表达。使用抗-V5 抗体的免疫共沉淀和随后的使用抗-Myc 抗体的免疫印迹表明, MK2 能与 Shc 免疫共沉淀。图 10B 表明, 如 Western 印迹所检测到的, HA- HPH2、HA-p38 和 Myc-MK2 都有表达。使用抗-HA 抗体的免疫共沉淀和随后的使用抗-Myc 抗体的免疫印迹表明, MK2 能与 HPH2 和 p38 免疫共沉淀。

10 图 11 说明了 RAW264.7 巨噬细胞中的 TNF- α 蛋白 (pg/ml) 的水平。如图所示, 与只含有载体、p38、MK2 或 Shc 的细胞中的 TNF- α 水平相比, 共同表达 p38 和 Shc 或 MK2 和 Shc 的茴香霉素刺激的 RAW264.7 巨噬细胞中的 TNF- α 水平有所增高。这样, Shc 表现为促炎的, 因为它能提高 MK2 活性。

15 图 12A 描述了一个 2D 放射自显影, 它显示了使用二维凝胶电泳分辨的来自 MK2 +/+ 和 MK2 -/- 小鼠胚胎成纤维细胞的 ³³P 标记的蛋白。显示了不同地磷酸化的蛋白 (箭头), 它具有等电点 5.4。图 12B 显示了相同凝胶的银染色, 描述了分辨的蛋白的相对丰度。

图 13A 描述了在存在 MK2 或 MK2 和 Shc 的情况下, 在有和没有茴香霉素刺激的 HeLa 细胞中检测磷酸化的 Hsp 27 (pHsp 27) 的 western 印迹。如图所示, V5-p66 Shc A 和 MK2 都在 HeLa 细胞中表达, 与抗-pHsp 27 的免疫印迹证实, 在表达 MK2 或 MK2 和 Shc 的细胞中的基础 pHsp 27 蛋白的水平有所升高。图 13B 描述了在有和没有茴香霉素刺激的 HeLa 细胞中, 用单独的载体 (V)、单独的 MK2、单独的 Shc 或 MK2 和 Shc 转染的 HeLa 细胞中的基础磷酸化的 Hsp 27 蛋白的水平。磷酸化的 Hsp 27 蛋白的水平对单独载体转染的无刺激细胞中的水平进行标准化。图 13C 描述了对 MK2 和载体 (V) 或 MK2 和 Shc 转染的 HeLa 细胞中的 MK2 水平标准化的基础磷酸化的 Hsp 27 的水平。

30 图 14A 描述的 western 印迹表明 Shc 和 MK2 都在 RAW264.7 细胞中表达。用抗-肌动蛋白抗体证实了在每条带上加载了等量的总蛋白。图 14B 描述了通过 ELISA 测得的在用单独的载体 (V)、单独的 MK2、单独的 Shc 或 MK2 和 Shc 转染的有和没有 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中分

泌的 TNF- α 蛋白的水平。

图 15A 描述了包含 CH2 域、PTB 域、CH1 域和 SH2 域的 p66Shc A 蛋白的略图。还显示了蛋白中的 MK2 相互作用域、CAM 激酶 2 共有序列和 GSK3 序列。图 15B 描述了在使用从转染的 293T 细胞免疫沉淀出的重组 MK2 和 V5-Shc A 进行的体外激酶测定中的 p66Shc A 的磷酸化。如图所示，只在表达 Shc 的细胞的免疫沉淀物中检测出磷酸化的 Shc A。用 Coomassie 染色和使用 V5-抗体的 western 印迹确认了在 Shc A 转染的细胞中表达 Shc A。

图 16 的略图说明了，作为对细胞应激的反应由 MK2 调节的应激激活的途径和作为对细胞应激激活 MK2 的反应的 Shc 磷酸化。

图 17 描述的 western 印迹显示了反应于 MK2^{-/-}和 MK2^{+/+} 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 中的过氧化氢 (H₂O₂) 的磷酸化的 AKT 和 FKHR-L1 水平。如图所示，与 MK2^{+/+} MEFs 中的水平相比，MK2^{-/-}MEFs 中的磷酸化的 AKT 和磷酸化的 FKHR-L1 水平都有降低。

15

序列简述

下表提供了本申请中的序列信息。

序列 ID 号	图	序列描述
SEQ ID NO: 1	1A 和 1B	编码 STS 的 cDNA 序列
SEQ ID NO: 2	2A 和 2B	编码 HPH2 的 cDNA 序列
SEQ ID NO: 3	3A 和 3B	编码 Shc 的 cDNA 序列
SEQ ID NO: 4	4	SEQ ID NO: 1 的 cDNA 序列编码的 STS 氨基酸序列
SEQ ID NO: 5	5	SEQ ID NO: 2 的 cDNA 序列编码的 HPH2 氨基酸序列
SEQ ID NO: 6	6	SEQ ID NO: 3 的 cDNA 序列编码的 Shc 氨基酸序列

定义

术语“复合物”是指两个或多个蛋白的缔合。这样的缔合可以是共价的或非共价的，包括例如复合物中两个蛋白之间的离子的、亲水的和疏水的相互作用。典型地，能形成复合物的蛋白会彼此相互作用，

20

所以只要鉴别或检测出复合物中的第一种蛋白，就能鉴别或检测出与第一种蛋白形成复合物的其它蛋白。可以体内（例如在形成复合物的细胞中）鉴别出蛋白复合物，其中两个或多个蛋白天然地彼此缔合。或者，可以体外形成复合物，当将这些蛋白加入到同一反应混合物中时，会发生两个或多个蛋白之间的相互作用。用于检测复合物中的蛋白的方法包括但不限于共免疫沉淀、酵母双杂交、荧光共振能量转移和断开（pull-down）实验。MK2复合物是含有MK2和至少一种其它蛋白的复合物。

术语“共免疫沉淀”是指一种检测两种蛋白之间的相互作用的方法。例如，通过共免疫沉淀可以检测出在293T细胞中共表达的HA-标记的MK2相互作用蛋白（例如Shc）和MYC-标记的MK2之间的相互作用。从共表达两种蛋白的细胞制备出细胞裂解物，随后用抗-HA抗体进行免疫沉淀。通过SDS PAGE分辨免疫沉淀物，并用抗-MYC抗体进行免疫印迹来检测共免疫沉淀的MK2。

术语“HPH2”是指人多同源异形同源物2，它是多峰房组(PcG)蛋白中的一种，其分子量为约51 kDa。HPH2与MK2相互作用形成复合物，由此调节MK2活性。术语“HPH2”还包括HPH2的变体，包括能与MK2相互作用的剪接变体、同源物、包含HPH2的融合蛋白、截短和缺失突变体、片段、取代突变体、添加突变体、改组突变体和HPH2基序。这样术语“HPH2”还指HPH2的功能变体，包括与MK2相互作用的HPH2片段。HPH2与果蝇PcG蛋白“多同源异形体”和小鼠Rae28/Mph1蛋白是同源的(Gunster等, *Molec. Cell. Biol.*, 17: 2326-2335 (1997))。在果蝇中，PcG基因是细胞记忆系统的一部分，它负责基因活性的稳定遗传。PcG蛋白能形成较大的多聚的染色质相关蛋白复合物，并且含有锌指基序和两个指定为同源性域I和II的区域。这些复合物在发育过程中维持转录沉默/激活，并且在细胞周期（特别是细胞分裂）中维持转录记忆。PcG基因的突变与造血细胞的增殖缺陷相关，表明这些蛋白能调节造血作用。图2A和2B提供了HPH2的cDNA序列（对应SEQ ID NO: 2），图5提供了该蛋白的氨基酸序列（对应SEQ ID NO: 5）。图8B显示了HPH2的结构和HPH2中的MK2相互作用域，图9C说明了MK2中的HPH2相互作用域。HPH2具有保守的C端不育 α 基序(SAM)蛋白相互作用域，它在许多信号蛋白（包括激酶、支架

(scaffolding) 蛋白、接头 (adaptor) 蛋白和 GTPA 酶以及转录因子的 ETS 家族成员) 中都有发现。相信 HPH2 是转录调节剂。

术语“炎症”是指一种基本病理过程，它由反应于物理剂、化学剂或生物剂造成的损伤或异常刺激的在受影响的血管和周围组织中发生的细胞学和组织学反应的动态复合物组成。

术语“炎症状况”只是其中以炎症为症状的状况。这样的状况包括但不限于克隆氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、迟发型过敏反应、哮喘、系统性红斑狼疮和由于创伤或卒中（例如缺血性脑损伤）引起的炎症。

术语“MK2”和“MK2 多肽”是指 MAPKAP 激酶 2，一种在 Stokoe 等人 (Biochem. J. 296: 843-849 (1993)) 中公开的蛋白。该蛋白是 Ser/Thr 激酶，最初鉴别为 hsp25/27 激酶。已经证实该蛋白激酶在被 p38 有丝分离原激活的蛋白激酶 (p38 MAP 激酶) 磷酸化以后仍有活性。认为 MK2 在转录后调节 TNF，并且在调节其它细胞因子中也是重要的。MK2 的 cDNA 序列分析揭示了下述特征（按 5' 至 3' 的次序）：含有 2 个推定的 SH3-结合位点的富含脯氨酸的区域、激酶催化域、MAP 激酶磷酸化的苏氨酸残基和核定位信号。MK2^{-/-}敲除的小鼠是能存活的，但是 LPS 诱导的 TNF- α 生物合成有 90% 的减少，并且这些小鼠对 LPS 诱导的休克有抗性。术语“MK2”还包括 MK2 的变体，包括具有 MK2 活性的剪接变体、同源物、包含 MK2 的融合蛋白、截短和缺失突变体、片段、取代突变体、添加突变体、改组突变体和 MK2 基序。该术语还包括 MK2 的功能变体，其中 MK2 蛋白的变体或其片段具有 MK2 活性，如通过这里所述的一个或多个测定和本领域已知的测定所测得的。

术语“结合 MK2 的蛋白”和“MK2 相互作用蛋白”是指能粘附 MK2 或与之缔合的蛋白。该术语包括在含有 MK2 的复合物中发现的蛋白。该术语还指具有一种或多种与天然蛋白相关的生物活性的这样的蛋白的任何变体（包括剪接变体、截短、片段、取代、添加和缺失突变体、融合蛋白、改组序列、基序序列和同源物）。这些蛋白还包括已经修饰过的氨基酸序列，其带有对天然蛋白的保守或不保守改变。这些蛋白可以来自任何来源，天然的或合成的。蛋白可以是人源的或来自动物源的，包括牛、鸡、小鼠、大鼠、猪、羊、火鸡、狒狒和鱼。能结合 MK2 的蛋白可以刺激 MK2 活性、抑制 MK2 活性或对 MK2 的活性无影

响。

术语“Shc”是指同源性和胶原蛋白(Migliaccio等, Nature, 402: 309-313 (1999))。术语“Shc”还包括 Shc 变体, 包括剪接变体、同源物、含有 Shc 的融合蛋白、截短和缺失突变体、片段、取代突变体、添加突变体、改组突变体和 Shc 的基序序列, 它们与 MK2 相互作用。该术语包括 Shc 的功能变体, 其中变体 Shc 蛋白与 MK2 相互作用从而调节 MK2 活性。图 3A 和 3B 提供了 Shc 蛋白(Shc A)的 cDNA 序列(对应 SEQ ID NO: 3), 图 6 提供了该蛋白的氨基酸序列(对应 SEQ ID NO: 6)。图 8A 和 16A 显示了 Shc 蛋白的不同域, 包括 CH2、PTB、CH1、SH2 和 MK2 相互作用域。图 9C 显示了 MK2 中与 Shc 相互作用的域。Shc A 蛋白的三种异构体(46、52 和 66-kDa)在与细胞表面受体结合后被磷酸化。两个小异构体通过不同的翻译起点生成, 而具有独特 N 端 CH 域(CH2)的 66 kDa 异构体则通过可变剪接生成。Src 源性 2 (SH2)和磷酸酪氨酸结合(PTB)域会结合被激活的细胞表面受体上的磷酸酪氨酸, 导致 CH 1 域的酪氨酸磷酸化, 这促进了 Grb2 和 SOS 的募集。许多被激活的细胞表面受体通过两个较小的 Shc A 异构体传递信号, 以激活 Ras MAP 激酶途径。相反, 尚未发现结合到这些受体上的 p66 能激活该有丝分裂途径。胶原蛋白源性 2 (CH2)域是 p66 独有的且含有丝氨酸 36, 它因氧化应激而被磷酸化。Shc 的哺乳动物异构体调节如生长(p52/p46Shc)、细胞凋亡(p66Shc)和寿命(p66Shc)的多种功能(Luzi 等, Curr. Opin. Genetics and Development, 10: 668-674 (2000))。

确信 Shc A 是信号转换磷酸蛋白。Shc A 蛋白的 p46 和 p52 异构体在除了脑和神经元(在这里受发育调节)之外的地方普遍表达。p66 在特定的细胞类型和组织中表达。因为 p66 不能激活 Ras MAPK 途径, 认为它的结合(假定其与两种更小的 Shc A 异构体的结合竞争)会通过其差异表达来调节 Ras MAPK 途径的激活。已经在分离自 p66^{-/-}小鼠的细胞中证实, p66 作用于 p53 的下游来介导对氧化应激(包括细胞内的 ROS 和细胞凋亡)的细胞反应。该活性需要 p66 异构体(S36)中的位点 36 处的丝氨酸残基的磷酸化。已经证实两种 MAP 激酶(Erk 和 Jnk)参与该丝氨酸的磷酸化。

术语“与 smoothelin 相似的”或“STS”是指与 smoothelin 密

切相关的特定蛋白。术语“STS”还包括 STS 的变体，包括剪接变体、同源物、STS 的融合蛋白、截短和缺失突变体、片段、取代突变体、添加突变体、改组突变体和 STS 的基序序列，它们与 MK2 相互作用。该术语包括 STS 的功能变体，其中变体 STS 蛋白与 MK2 相互作用。尚未完全发现 STS 的特征，但是 STS 的预测 cDNA 记载在国家卫生部的国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 数据库中，其预测的分子量是 100 kDa。STS 与 smoothelin 有 94% 的相同，两种蛋白都有钙调理蛋白同源性和肌动蛋白结合域，这基于与 NCBI 数据库中的已知蛋白的序列同源性。这些蛋白含有肌动蛋白结合域 (ABD) 和钙调理蛋白同源性域 (CH)。van der Loop 等, J. Cell Biol., 134: 401-411 (1996) 确认, smoothelin 与以下序列具有显著的同源性, 该序列与肌营养不良蛋白、utrophin、 β -血影蛋白和 α -辅肌动蛋白的肌动蛋白结合域侧接。细胞分级研究提示了发明人, smoothelin 是细胞骨架的一部分。Northern 印迹分析表明, 基因在几种含有血管平滑肌的组织中表达, 但不在脑、脂肪组织、心肌或骨骼肌中表达。但是 STS 的表达模式有待测定。图 1A-1B 提供了编码 STS 的 cDNA 序列 (对应 SEQ ID NO : 1), 图 4 提供了该蛋白的氨基酸序列 (对应 SEQ ID NO : 4)。图 8C 显示了 STS 蛋白的结构, 包括 MK2 结合区。它具有 C 端肌动蛋白结合域 (ABD) 和钙调理蛋白同源性域 (CH)。图 9C 显示了 MK2 中与 STS 相互作用的域。确信 STS 是与细胞骨架相关的蛋白。

术语“治疗益处”是指状况症状的改善、状况进程的减缓或状况进展的停止。治疗益处是通过对比状况的一个方面 (例如施用至少一种能结合 MK2 的蛋白前后的炎症程度) 来确定的。治疗益处还可以通过对比状况的一个方面 (例如施用至少一种能抑制 MK2 与蛋白的相互作用的试剂前后的炎症程度, 其中所述的相互作用会刺激 MK2 活性) 来确定。因此, 治疗益处还可以通过对比状况的一个方面 (施用至少一种能促进 MK2 与蛋白的相互作用的试剂前后, 其中所述的相互作用会抑制 MK2 活性) 来确定。

但是对于某些状况, 例如某些细菌感染 (例如单核细胞增生利斯特氏菌感染), 需要增强 MK2 活性。因此, 治疗益处还可以通过施用一种能增强 MK2 活性或促进 MK2 与蛋白的相互作用 (其中所述的相互

作用会增强 MK2 活性) 的试剂前后对这种感染的抗性的增加来确定, 例如导致对细菌感染的抗性的增加。

5 术语“治疗”是指治疗性的处理和预防性的处理。需要治疗的对象可以包括已经具有特定医学状况的个体和可能最终获得所述状况的个体(即那些对所述状况敏感因而需要预防措施的)。例如, 该术语包括会导致下述结果的任何处理: 减少疾病或状况的严重程度, 缩短病程的持续时间, 改善一种或多种与疾病或状况相关的症状, 患有疾病或状况的患者的有益效果, 不再必须治愈该疾病或状况, 和预防一种或多种与疾病或状况相关的症状。

10 如这里所使用的, 术语“域”是指具有区别性的物理特征或作用(包括, 例如独立的结构或功能)的多肽(包括蛋白)的区域。域所指的多肽部分对于该多肽可以是天然的或非天然的。域可以含有具有区别性的物理特征的氨基酸序列, 或者它可以含有其序列片段。域可以与多肽或蛋白中的其它域相互作用。在本发明的一些实施方案中, 15 MK2 多肽和/或 MK2 相互作用蛋白包括选自亲和力标记、放射性核苷酸、酶和荧光团的域。这样的域可以用于分离或纯化包含 MK2 和相互作用蛋白的复合物, 或用于分离包含该域的蛋白。域的实例包括但不限于聚组氨酸、FLAG、Glu-Glu、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白 A、蛋白 G 和免疫球蛋白重链恒定区。

20 术语“融合蛋白”是指这样的蛋白, 其中来自第一来源的第一个氨基酸序列共价地或非共价地连接到来自第二来源的第二个氨基酸序列, 其中第一个和第二个氨基酸序列不同。不同的第一来源和第二来源可以包括两种不同的生物实体, 或来自同一生物实体的两种不同蛋白, 或生物实体和非生物实体。融合蛋白可以包括例如来自至少 2 种 25 不同生物来源的蛋白。生物来源可以包括任何非合成地生成的核酸或氨基酸序列(例如, 基因组或 cDNA 序列、质粒或病毒载体、天然毒粒或突变体或类似物, 如这里进一步描述的, 如上任一种)。合成来源可以包括化学地且不是通过生物系统生成的蛋白或核酸序列(例如, 氨基酸序列的固相合成)。融合蛋白还可以包括源自至少 2 种不同合 30 成来源的蛋白或源自至少 1 种生物来源和至少 1 种合成来源的蛋白。

在提到蛋白或多肽时, 术语“分离的”是指从其自然的或天然的环境或来源分离出的蛋白或多肽。这样, 从细胞分离出的蛋白或多肽在

制备后基本上不含有细胞中的其它多肽和组分。

如这里所使用的，术语“重组的”是指多肽，其来源或操作与全部或部分多肽（与其在本质上自然地相关）无关，其中这样的多肽在本质上不是自然地产生的。

- 5 术语“Y2H”是指检测两种蛋白之间的相互作用的酵母双杂交系统。该双杂交使用酵母转录激活剂 GAL4，它分成两个功能上不同的域。DNA 结合域在与异源蛋白 X 融合时保留其 DNA 结合活性，激活域在与异源蛋白 Y 融合时保留其转录激活性质。两种融合蛋白或杂交蛋白在酵母中共表达。如果蛋白 X 和蛋白 Y 之间有相互作用，该缔合会使转
- 10 录激活剂的激活域密切缔合其结合域，由此重构有功能的转录激活剂。重构的转录激活剂然后可以驱动许多整合进酵母基因组（它们含有 DNA 结合域的结合位点）中的报道基因的表达。报道基因的表达指示着蛋白 X 和蛋白 Y 之间的相互作用。

具体实施方式

15 A. MK2 相互作用蛋白

本发明涉及与 MK2 相互作用的蛋白。已知与 MK2 相互作用的蛋白实例包括但不限于 SRF、CREB、ER81、小热休克蛋白、淋巴细胞特异性蛋白 1、E47、Akt 和 5-脂氧化酶。

- 20 以前已经通过 Y2H 系统测定证实 HPH2 能结合 MK2 (B. Neufield, Neue Interaktionspartner der MAPKAP-kinasen 3pK und MK2 : die Polycomb-Proteine HPH2 und Bmi1 sowie der basische Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor E47 (2000) (未发表的理学博士论文, University of Wurzburg)。本发明确认了该发现(图 2A 和 2B, 图 9B 和实施例 5)。另外, 在本发明中使用 Y2H 系统证实了 STS (图
- 25 1A 至 1B, 图 9B 和实施例 5) 和 Shc (图 3A 和 3B, 图 9B 和实施例 5) 能结合 MK2。

- 可以使用多种方法分离出结合 MK2 的蛋白。例如, 可以使用实施例 7 所例示的共免疫沉淀。V-5 或 HA-标记的 MK2 相互作用蛋白和 MYC-标记的 MK2 在细胞中共表达。用抗-HA 或抗-V5 抗体制备并免疫沉淀
- 30 细胞裂解物。通过 SDS PAGE 分辨免疫沉淀物, 并用抗-MYC 抗体进行免疫印迹来检测共免疫沉淀的 MK2。

还可以使用如实施例 1-5 所例示的酵母双-杂交(Y2H)系统。该方

法由 Fields 和 Song 首次正式记载 (Nature, 340: 245-246 (1989))。该双杂交系统使用酵母转录激活剂, 例如分成两个功能上不同域的 GAL4。GAL4 DNA 结合域在与异源蛋白 X 融合时保留其 DNA 结合活性。GAL4 激活域在与异源蛋白 Y 融合时保留其转录激活性质。两种融合蛋白或杂交蛋白在酵母中共表达。如果蛋白 X 和蛋白 Y 之间有相互作用, 该缔合会使 GAL4 的激活域密切缔合其结合域, 由此重构有功能的转录激活剂。重构的转录激活剂然后可以驱动许多整合进酵母基因组 (它们含有 DNA 结合域的结合位点) 中的报道基因的表达。报道基因的表达指示着蛋白 X 和蛋白 Y 之间的相互作用。

Y2H 系统提供了几个超过了许多研究蛋白-蛋白相互作用的传统方法的优点 (Luban 等, Curr. Opin. Biotech., 6: 59-64 (1995))。首先, 不再需要体外生化结合测定所必需的复杂的和费力的操作条件, 因为相互作用发生在体内。其次, Y2H 系统是高度敏感的, 可以检测出其它方法不能发现的相互作用 (Fields 等, Trends in Genetics, 10: 286-291 (1994))。最后, 当用于为能与目标蛋白相互作用的编码蛋白筛选 cDNA 库时, Y2H 系统是非常有效的。

除了 Y2H 系统外, 哺乳动物的 2-杂交系统也可以用于研究 MK2 和其它蛋白之间的相互作用。例如, 可以用下述物质转染 293T 细胞: 含有结合报道基因 (例如荧光素酶或氯霉素乙酰转移酶 (CAT)) 上游的 GAL4 的 DNA 序列的质粒; 含有编码融合到 GAL4 的 DNA-结合域的 MK2 的 cDNA 的质粒; 和含有编码与 MK2 相互作用的蛋白 (如通过 Y2H 所鉴别的) 或融合到 VP16 激活剂的推定的 MK2 相互作用蛋白的 cDNA 的质粒。共表达 MK2 和相互作用蛋白后裂解转染的细胞, 用裂解物进行报道基因活性测定, 该活性只有在 MK2 与蛋白相互作用时才可检测出。通过该测定, 可以确定哺乳动物细胞中 MK2 和蛋白之间的相互作用。哺乳动物的双杂交系统还可以用于验证 MK2 和其它蛋白之间的相互作用, 如通过 Y2H 所鉴别的。

除了使用共免疫沉淀或双杂交系统外, 还可以使用 cDNA 文库的低严格性筛选, 或使用简并 PCR 技术, 该 PCR 技术使用针对编码能结合 MK2 的蛋白的 MK2 结合域的序列的探针。随着更多的基因组数据变得可以获得, 可以通过使用许多序列绘制和分析程序 (例如 MotifSearch (Genetics Computer Group, Madison, WI), ProfileSearch (GCG)

和 BLAST (NCBI)) 的相似性检索来发现新的含有与能结合 MK2 的蛋白的 MK2 结合域具有显著同源性的序列的蛋白。

还可以使用蛋白质组方法鉴别 MK2 相互作用蛋白, 如实施例 11 所示。用野生型 (+/+) 或 MK2 缺陷型 (-/-) 细胞铺板, 并用 ^{33}P 标记。激活 MK2 30 分钟, 随后制备全细胞裂解物, 并用 2 维凝胶电泳进行分析。对比凝胶以鉴别出有差异地磷酸化的蛋白。图 12 显示了使用该方法的有差异地磷酸化的蛋白 (箭头)。还可以使用质谱法鉴别出有差异地磷酸化的蛋白。

结合 MK2 的蛋白会刺激 MK2 活性、抑制 MK2 活性或对 MK2 活性无影响。有几种方法可研究结合 MK2 的蛋白是否会抑制或刺激 MK2 从而具有生物活性。结合 MK2 的蛋白会改变 MK2 活性, 特别是降低 MK2 活性, 是可以用作治疗剂和炎症抑制剂的特别好的备选品。另外可以发现, 能自然地刺激 MK2 的蛋白的片段或突变体会抑制 MK2, 这样可以用作炎症抑制剂的备选品。例如, 一旦鉴别了出结合 MK2 的蛋白并且证实了它会刺激 MK2, 可以在蛋白中进行突变, 这样该蛋白仍然能与 MK2 相互作用, 但是对 MK2 活性没有抑制作用。在一个或多个这里提供的测定中, 可以测试突变体形式的 MK2 相互作用蛋白对 MK2 活性的影响。结合 MK2 但是对其活性无影响的蛋白也可以用作治疗剂。这样的蛋白可以例如与通常能结合 MK2 以刺激 MK2 活性的内源蛋白相竞争。

为了研究结合 MK2 的蛋白是否影响其活性, 可以测定结合蛋白对 MK2 活性 (例如 MK2 激酶活性) 的影响。例如, HA-标记的 MK2 相互作用蛋白 (例如 Shc) 和 Myc-标记的 MK2 可以在 293T 细胞中共表达。制备细胞裂解物, 并通过 SDS PAGE 分辨。随后用抗体进行免疫印迹, 检测激活的 MK2 (例如抗-磷酸 MK2 苏氨酸 334), 确定 MK2 的激活状态。或者, 通过对磷酸化形式的已知 MK2 底物量进行定量, 可以确定 MK2 结合对 MK2 激酶活性的影响。

另外, 可以确定 MK2 相互作用蛋白对 TNF- α 生物合成的影响, 如实施例 9 所例示。可以将 HA-标记的 MK2 相互作用蛋白 (例如 Shc) 和 MYC-标记的 MK2 与 TNF 荧光素酶报告基因一起共转染到合适的细胞 (例如 RAW) 中。用或未用茴香霉素刺激细胞。收集培养基分析 TNF 的生成, 制备细胞裂解物以确定荧光素酶活性。将在有 MK2 结合蛋白存在的情况下的 TNF 生物合成与对照样品进行对比。

如实施例 10 所例示，还可以确定 MK2 对 MK2 相互作用蛋白的磷酸化状态的影响。HA-标记的 MK2 相互作用蛋白(例如 Shc)在 293T 细胞中表达。制备裂解物，用抗-HA 抗体进行免疫沉淀。免疫沉淀物用于重组 MK2 作激酶的体外激酶测定。用 SDS PAGE 随后进行磷酸-成像检测

5 MK2 相互作用蛋白的磷酸化。

B. 核苷酸和蛋白序列

虽然不总是必须的，如果需要，本领域的普通技术人员可以确定能结合 MK2 的新蛋白的氨基酸或核酸序列。例如，本发明提供了编码 STS、HPH2 和 Shc 的 cDNA 序列(图 1A 和 1B ; 2A 和 2B; 3A 和 3B; 和

10 SEQ ID NO: 1-3)。本发明还提供了这些蛋白的对应的氨基酸序列(图 4-6; SEQ ID NO: 4-6)。

本发明还包括这样的核酸和氨基酸序列的剪接变体、截短、片段、取代、添加或缺失突变、融合蛋白、改组突变体、基序序列和同源物。例如，核酸或氨基酸序列可以包含与天然蛋白的核酸或氨基酸序列有

15 至少 70%~79%相同、或至少 80%~89%相同、或至少 90%~95%、或至少 96%~100%相同的序列。本领域的技术人员能够认识到，结合 MK2 的区域能耐受比不参与结合的蛋白其它部分更少的序列变化。这样，MK2 相互作用蛋白的这些非结合区域可以含有未显著地改变蛋白对 MK2 的结合的显著变化。但是，本领域的技术人员还能够认识到，可以

20 作出许多变化来特异性地增加该蛋白对其目标的亲和力。这样的增加亲和力的变化典型地典型是通过改变氨基酸序列(例如在 MK2-结合区内)和测试该蛋白结合 MK2 的能力或通过测定该结合的程度来确定的。所有的这些改变(无论是在蛋白的 MK2 结合区之内或之外)都在本发明的范围内。

25 本领域的技术人员能够认识到，能结合 MK2 的蛋白可以含有任意数量的对它们的各氨基酸序列的保守变化，而不改变它们的生物学性质。这样的保守氨基酸修饰是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。本领域的技术人员熟知具有这样特征的示例性的保守取代，它们包括例如精氨酸至赖氨酸或

30 赖氨酸至精氨酸；谷氨酸至天冬氨酸或天冬氨酸至谷氨酸；丝氨酸至苏氨酸或苏氨酸至丝氨酸；谷氨酰胺至天冬酰胺或天冬酰胺至谷氨酰胺；缬氨酸至亮氨酸或异亮氨酸，亮氨酸至缬氨酸或异亮氨酸，和异

亮氨酸至缬氨酸或亮氨酸。而且，结合 MK2 的蛋白可以用于生成能结合和抑制 MK2 活性的功能片段。

使用序列分析软件包 (Sequence Analysis Software Package™) (第10版; Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI) 的 “Best Fit” 或 “Gap” 程序，可以确定相对的序列相似性或同一性。“Gap” 使用 Needleman 和 Wunsch (Needleman 和 Wunsch, 1970) 的算法来发现两个序列的比对，它使匹配的数目最大化且使空位的数目最小化。“Best Fit” 执行两个序列之间相似性的最佳片段的最佳比对。使用 Smith 和 Waterman 的局部同源性算法 (Smith 和 Waterman, J Theor Biol., 91 (2): 379-80 (1981))，通过插入空位使匹配的数目最大化发现最佳比对。

上述的序列分析软件包含有许多其它的有用的鉴别这里公开的核苷酸和氨基酸序列的同源物的序列分析工具。例如，“BLAST” 程序 (Altschul 等, J Mol Biol., 215 (3): 403-10 (1990)) 能在指定的数据库 (例如, NCBI 维护的序列数据库) 中搜索与查询序列 (肽或核酸) 相似的序列; “FastA” (Lipman 和 Pearson, Science, 227 (4693): 1435-41 (1985); Pearson 和 Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (8) : 2444-8 (1988)) 执行关于查询序列和一组相同类型序列 (核酸或蛋白) 之间的相似性的 Pearson 和 Lipman 搜索; “TfastA” 执行关于蛋白查询序列和任一组核苷酸序列 (在进行对比之前, 它将该核苷酸序列翻译成所有的 6 个阅读框架) 之间的相似性的 Pearson 和 Lipman 搜索; “FastX” 执行关于核苷酸查询序列和一组蛋白序列之间的相似性的 Pearson 和 Lipman 搜索, 考虑移码; “TfastX” 执行关于蛋白查询序列和任一组核苷酸序列之间的相似性的 Pearson 和 Lipman 搜索, 考虑移码 (在进行对比之前, 它翻译两条链的核酸序列)。

本发明包括结合 MK2 的蛋白的片段。这样的片段很可能包括蛋白的 MK2 结合区的全部的或一部分。片段可以包括能结合 MK2 的区域和蛋白的 N-端之间的序列和/或能结合 MK2 的区域和蛋白 C-端之间的序列的全部、一部分或不包括所述序列。

本领域的普通技术人员能够理解，蛋白中的某些氨基酸可以取代之为其它氨基酸，而不负面地影响蛋白活性，例如结合 MK2 的蛋白的结

合特征。发明人这样预期，可以对结合 MK2 的蛋白的氨基酸序列或编码该蛋白的 DNA 序列进行各种改变，而不引起它们的生物学用途或活性的显著损失。这样的改变可以包括剪接变体、截短、片段、取代、添加和缺失突变、改组突变、基序序列、融合蛋白、同源物等。

5 在作出这样的改变时，可以考虑氨基酸的亲水指数。本领域通常能理解亲水氨基酸指数在赋予蛋白生物学功能中的重要性 (Kyte 和 Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105-132 (1982))。公认的是，氨基酸的相对亲水特征有助于得到的蛋白的二级结构，这又决定了该蛋白与其它分子 (例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等) 的相互作用。

10 以每一种氨基酸的疏水性和电荷特征为基础，为它指定一个亲水指数；它们是异亮氨酸 (+4.5)、缬氨酸 (+4.2)、亮氨酸 (+3.8)、苯丙氨酸 (+2.8)、半胱氨酸/胱氨酸 (+2.5)、蛋氨酸 (+1.9)、丙氨酸 (+1.8)、甘氨酸 (-0.4)、苏氨酸 (-0.7)、丝氨酸 (-0.8)、色氨酸 (-0.9)、酪氨酸 (-1.3)、脯氨酸 (-1.6)、组氨酸 (-3.2)、谷氨酸 (-3.5)、谷氨酰胺 (-3.5)、天冬氨酸 (-3.5)、天冬酰胺 (-3.5)、赖氨酸 (-3.9) 和精氨酸 (-4.5)。在作出这样的改变时，取代的氨基酸的亲水指数可以是在被替换的氨基酸 ± 2 之内、在 ± 1 之内和在 ± 0.5 之内。

15 本领域还能理解，在亲水性的基础上可以有效地进行相似氨基酸的取代。美国专利 4,554,101 声称，蛋白的最大的局部平均亲水性 (受其临近氨基酸的亲水性的控制) 与该蛋白的生物学性质相关。

20 如美国专利 4,554,101 所述，为氨基酸残基指定了下述亲水性值：精氨酸 (+3.0)、赖氨酸 (+3.0)、天冬氨酸 (+3.01)、谷氨酸 (+3.0 \pm 1)、丝氨酸 (+0.3)、天冬酰胺 (+0.2)、谷氨酰胺 (+0.2)、甘氨酸 (0)、苏氨酸 (-0.4)、脯氨酸 (-0.5 \pm 1)、丙氨酸 (-0.5)、组氨酸 (-0.5)、半胱氨酸 (-1.0)、蛋氨酸 (-1.3)、缬氨酸 (-1.5)、亮氨酸 (-1.8)、异亮氨酸 (-1.8)、酪氨酸 (-2.3)、苯丙氨酸 (-2.5) 和色氨酸 (-3.4)。在作出这样的改变时，取代的氨基酸的亲水指数可以是在被替换的氨基酸 ± 2 之内、在 ± 1 之内和在 ± 0.5 之内。

30 修饰可以是保守的，以便蛋白的结构或生物学功能不受改变的影响。这样保守的氨基酸修饰是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。本领域的技术人员熟知

具有各种前述特征的示例性的保守取代，它们包括例如精氨酸至赖氨酸或赖氨酸至精氨酸；谷氨酸至天冬氨酸或天冬氨酸至谷氨酸；丝氨酸至苏氨酸或苏氨酸至丝氨酸；谷氨酰胺至天冬酰胺或天冬酰胺至谷氨酰胺；缬氨酸至亮氨酸或异亮氨酸，亮氨酸至缬氨酸或异亮氨酸，
5 和异亮氨酸至缬氨酸或亮氨酸。能结合 MK2 的蛋白的氨基酸序列可以修饰成具有任何数量的保守改变，只要蛋白与 MK2 的结合不受负面影响即可。这样的改变可以引入到结合目标的蛋白部分之内或之外。例如，引入到蛋白结合部分的改变可以设计成提高该蛋白与其目标的亲和力。

10 C. 使修饰稳定

使修饰稳定能使蛋白稳定、提高蛋白的体外和/或体内半衰期、提高蛋白的循环半衰期和/或减少蛋白的水解降解。这样的使修饰稳定包括但不限于融合蛋白、糖基化位点的修饰和糖类部分的修饰。如本领域所熟知的，融合蛋白是这样制备的，将第二蛋白与第一蛋白框内融合，
15 使翻译的蛋白包含第一蛋白和第二蛋白。例如，在本发明中，融合蛋白可以这样制备，将能结合 MK2 的蛋白与第二蛋白（例如稳定剂蛋白部分）融合。如本领域普通技术人员所能认识到的，这样的融合蛋白可以任选地含有位于结合 MK2 的蛋白和稳定蛋白部分之间的连接蛋白。稳定剂蛋白可以是能够增强结合 MK2 的蛋白的总体稳定性的任何蛋白。
20

可以糖基化结合 MK2 的蛋白或将其连接到白蛋白或非蛋白聚合物上。例如，以美国专利号 4,640,835、4,791,192 或 5,414,135 所述的方式，可以将能结合 MK2 的蛋白连接到多种非蛋白聚合物中的一种上，例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。例如，通过共价连接到聚
25 合物上来化学修饰蛋白以提高它们的循环半衰期。美国专利号 4,766,106 和 4,609,546 还说明了聚合物和将它们连接到肽上的方法。

通过制备包含结合 MK2 的蛋白和免疫球蛋白序列的融合蛋白，可以稳定结合 MK2 的蛋白，如美国专利号 5,864,020 所例示。免疫球蛋白序列优选地（但非必须地）是免疫球蛋白恒定区。在本发明的嵌合体中的免疫球蛋白部分可以来自 IgG-1、IgG-2、IgG-3 或 IgG-4 亚型，
30 IgA、IgE、IgD 或 IgM，但优选来自 IgG-1 或 IgG-3。在一个实施方案

中，将 IgG 的 Fc 片段融合到了结合 MK2 的蛋白上。

可以聚乙二醇化结合 MK2 的蛋白。聚乙二醇化是一种将聚乙二醇 (PEG) 连接到蛋白上的方法，其目的是延长蛋白在体内的半衰期。聚乙二醇化结合 MK2 的蛋白可以减少为达到最佳的炎症减少所需要的施用蛋白的剂量或频率。该技术的综述记载在 Bhadra 等, *Pharmazie*, 57: 5-29 (2002), 和 Harris 等, *Clin. Pharmacokinet.*, 40: 539-551 (2001)。

可以将结合 MK2 的蛋白修饰成具有改变的糖基化方式(即从起始的或天然的糖基化方式改变来的)。如这里所使用的，“改变的”是指去除一个或多个糖类部分，和/或具有至少一个添加到起始蛋白上的糖基化位点。

蛋白的糖基化典型地是 N-连接的或 O-连接的。“N-连接的”是指糖类部分连接到天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是脯氨酸以外的任何氨基酸)是糖类部分酶促地结合到天冬酰胺侧链上的识别序列。这样，多肽中存在这些三肽序列中的任何一个都会产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖 N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一个连接到羟基氨基酸、最常见的丝氨酸或苏氨酸，尽管 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸也可以使用。

能结合 MK2 的蛋白的糖基化位点的添加常规地是通过改变蛋白的氨基酸序列以使其含有一个或多个上述的三肽序列来完成的(对于 N-连接的糖基化位点)。改变还可以通过在起始蛋白的序列中添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用它们取代来完成(对于 O-连接的糖基化位点)。还可以通过在 DNA 水平引入变化来改变蛋白的氨基酸序列。

增加蛋白上的糖类部分数量的另一种方法是将糖苷化学地或酶促地偶连到蛋白的氨基酸残基上。根据使用的偶连模式，糖可以连接到：(a) 精氨酸和组氨酸，(b) 游离羧基，(c) 游离巯基，例如半胱氨酸中的那些，(d) 游离羟基，例如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸中的那些，(e) 芳族残基，例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸中的那些，或(f) 谷氨酰胺的酰胺基。这些方法记载在 WO 87/05330, 和 Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 22: 259-306 (1981)。

在结合 MK2 的蛋白上的任何糖类部分的去除都可以化学地或酶促

地完成。化学地去糖基化需要将蛋白暴露于三氟甲磺酸或等同化合物中。该处理会切除键合的糖(N-乙酰基葡萄糖胺或N-乙酰基半乳糖胺)以外的大多数或全部的糖类,并保持氨基酸序列的完整。

化学地去糖基化记载在 Hakimuddin 等, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987);和 Edge 等, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)。酶促地切除蛋白上的糖类部分可以通过使用多种内切和外切糖苷酶来完成,如 Thotakura 等, Meth. Enzymol., 138: 350 (1987) 所述。

可以将结合 MK2 的蛋白连接到蛋白白蛋白或白蛋白衍生物上。将蛋白和多肽连接到白蛋白或白蛋白衍生物的方法是本领域熟知的,见,例如美国专利号 5,116,944。

D. 筛选能调节 MK2 活性的化合物

1. 酵母-2 杂交系统在药物筛选中的应用

本发明还提供了筛选能调节 MK2 活性的化合物(包括但不限于抗体、化学试剂、小分子、蛋白和肽)的方法。在一些实施方案中,一旦通过 Y2H 检测到 MK2 和其它蛋白之间的蛋白-蛋白相互作用,就可以将 Y2H 中的蛋白-蛋白相互作用用于高通量的药物筛选。例如,一旦检测出蛋白-蛋白相互作用,就可以用药物(包括抗体、化学试剂、肽、蛋白或小分子)处理含有两种蛋白(例如 MK2 和相互作用蛋白)的阳性酵母菌落(通过颜色和生长鉴别,如所述)。在存在药物的情况下的阳性酵母菌落的颜色或生长变化会指示对两种蛋白之间的相互作用的影响。

在一些实施方案中, MK2 相互作用蛋白会刺激 MK2 活性,它对宿主(包括细胞、组织或整个生物)具有促炎作用。因此,理想的是鉴别出能中断该相互作用的药物。因此,可以用 Y2H 系统鉴别能中断 MK2 和能刺激 MK2 活性的蛋白之间的相互作用的药物,由此导致该药物在治疗或预防炎症中的应用。

在其它实施方案中, MK2 相互作用蛋白会抑制 MK2 活性,在宿主(包括细胞、组织或整个生物)中产生抗炎作用。在该情况下,可以用 Y2H 系统鉴别能增强该相互作用的药物,这可以通过含有两种蛋白的酵母细胞的颜色和生长的变化来监视,如这里所述的。这样的药物随后可以用于治疗或预防炎症。

如上所述，在某些状况（例如某些细菌感染）的情况下，理想的是具有增强的 MK2 活性。因此，还可以用 Y2H 系统筛选能增强 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用、产生增强的 MK2 活性、从而增强对细菌感染的抗性的药物。这样的药物可以用于治疗或预防例如某些细菌感染，例如单核细胞增生利斯特氏菌感染。

2. 体外重构系统在药物筛选中的应用

还可以用体外重构系统鉴别能调节 MK2 活性的药物，包括但不限于小分子、抗体、肽和化学试剂。例如，通过这里提供的任何测定鉴别出蛋白-蛋白相互作用以后，可以用能抑制两种蛋白之间的相互作用的药物体外处理蛋白。如上所述，理想的是鉴别出能抑制 MK2 和其它蛋白之间的相互作用的药物，其中所述的相互作用能刺激 MK2 活性。另外，还可以用体外重构系统形成和分离包含 MK2 和至少一种 MK2 相互作用蛋白的蛋白复合物。这些复合物随后可以用于鉴别能抑制或促进复合物的形成从而调节炎症和/或抑制或刺激复合物中的 MK2 活性从而调节炎症的化合物。

MK2 和相互作用蛋白是在体外翻译系统（例如 Promega (Madison, WI) 提供的兔网状细胞裂解物-偶联的转录-翻译系统）中合成和 ³⁵S-标记的。按照所述，通过共免疫沉淀确认 MK2 和蛋白之间的相互作用。或者，可以使用表达系统（例如大肠杆菌或杆状病毒昆虫细胞）制备重组 MK2 和相互作用蛋白。这两种蛋白之间的相互作用可以通过与共免疫沉淀、ELISA 或荧光能量共振转移 (FRET) 相似的断开测定来检测。将受检化合物加入到体外翻译的蛋白的混合物中，按照所述进行共免疫沉淀。理想的化合物是能抑制 MK2 和蛋白之间的相互作用的化合物，如通过在重组产生的蛋白的免疫沉淀测定或断开测定中的相互作用的缺失或减少所测定的。这样的化合物随后可以用于治疗或预防炎症。在本发明的实验中可以测试其对炎症的影响的化合物的实例包括化学试剂、小分子、肽、蛋白和抗体。

还可以用体外重构系统鉴别能结合 MK2 和抑制 MK2 活性的化合物。例如体外翻译的 MK2 或纯化的 MK2 可以与化合物一起孵育，随后测试其磷酸化已知底物（例如 Hsp 27）或增加 TNF- α 生物合成的能力，如这里所述。但是，可以使用任何能测试 MK2 活性的测定。这样，将能抑制 MK2 活性的那些化合物鉴别为能够用于抑制或预防炎症的药

物。但是，能提高 MK2 活性的化合物可以用于治疗某些状况（其中需要提高 MK2 活性）。

E. 药物组合物

5 本发明提供了含有能结合 MK2 的蛋白的组合物。这样的组合物适合用于制药用途和施用给患者。该组合物典型地含有一种或多种能结合 MK2 的蛋白和药学上可接受的赋形剂。该组合物还包含蛋白复合物，它含有 MK2 和至少一种 MK2 相互作用蛋白。如这里所使用的，短语“药学上可接受的赋形剂”包括任何和所有与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这样的
10 介质和试剂在药物活性物质中的应用是本领域熟知的。该组合物还可以含有其它的活性化合物，它们提供补充的、附加的或增加的治疗功能。该药物组合物还可以与施用说明书一起包括在容器、包装袋或分配器中。

本发明的药物组合物还包括含有化合物的组合物，所述的化合物
15 包括通过一种或多种这里所述的方法鉴别出的小分子、抗体、化学试剂、蛋白和肽。施用这些化合物以治疗或预防炎症的合适剂量可以由医生容易地确定。剂量的实例包括但不限于 5 mg 至 500 mg, 50 mg 至 250 mg, 100 mg 至 200 mg, 50 mg 至 100 mg, 15 mg 至 85 mg, 30 mg 至 70 mg, 和 40 mg 至 60 mg。

20 本发明的药物组合物被制成能与其目的给药途径相容的剂型。完成给药的方法是本领域普通技术人员所已知的。给药可以是例如静脉内的、肌肉内的、直肠的或皮下的。

用于皮下用途的溶液或悬浮液典型包含一种或多种下述组分：无
菌稀释剂例如注射用水，盐水，固定油类，聚乙二醇，甘油，丙二醇，
25 或其它合成溶剂；抗细菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂例如乙二胺四乙酸；缓冲剂例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；和调节渗透压的试剂，例如氯化钠或葡萄糖。pH 可以用酸或碱调节，例如盐酸或氢氧化钠。这样的制剂可以包封在用玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量的小瓶中。

30 适合用于注射的药物组合物包括无菌水溶液或分散液和用于与无菌注射水溶液或分散液临时配制的无菌粉末。对于静脉内给药，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany,

NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的,且其流动程度为能容易地注射。它在生产和储存条件下必须是稳定的,并且必须不受微生物(例如细菌和真菌)的污染。载体可以是溶剂或分散介质,它含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)和它们的合适的混合物。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣(例如卵磷脂),通过使用表面活性剂维持分散需要的粒径。对微生物活动的预防可以通过多种抗细菌剂和抗真菌剂来实现,例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下,组合物中可以包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。通过在组合物中包括能延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以延长可注射组合物的吸收。

在一些实施方案中,能结合 MK2 的蛋白是与载体一起制备的,所述的载体能保护蛋白以免在体内迅速消除,例如包括植入物和微胶囊化的输送系统的控释制剂。可以使用可生物降解的、可生物利用的聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。本领域的技术人员能明白制备这样的制剂的方法。这些物质也可以商业地购自 Alza Corporation (Mountain View, CA)和 Nova Pharmaceuticals。含有能结合 MK2 的蛋白的脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载体。它们可以根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如如美国专利号 4,522,811 所述。

对要治疗的状况有益的其它治疗上有用的试剂可以任选地包括在其中,或者与能结合 MK2 的蛋白同时或先后施用。

为了施用容易和剂量均匀,将组合物特别有益地制成剂量单位形式。这里使用的“剂量单位形式”是指物理上分离的单位,它适合作为要治疗的对象的单位剂量。每一个单位典型地含有预定量的活性化合物,其经过计算与需要的药物载体一起产生理想的治疗效果。关于本发明的剂量单位形式的说明,遵从或直接地取决于活性化合物的独特特征和要达到的特定治疗效果以及本领域关于使用这样的活性化合物治疗个体时所固有的限制。

30 F. 治疗适应症

能与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物可以用于预防、诊断或治疗人或动物的多种医学状况。因此,本发明提供了一

种治疗与炎症相关的状况的方法，包括给对象施用足以改善状况症状量的组合物，它包含至少一种能与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物（例如蛋白、肽、抗体、化学试剂和小分子）。这样的状况包括克隆氏病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、迟发型过敏反应、哮喘、系统性红斑狼疮和由于创伤或损伤或卒中引起的炎症。

G. 使用能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用的化合物的治疗方法

能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用、调节 MK2 活性的化合物可以用于抑制或减少一种或多种与炎症相关的症状。在一个实施方案中，炎症被抑制了至少 50%，或至少 60、62、64、66、68、70、72、72、76、78、80、82、84、86 或 88%、或至少 90、91、92、93 或 94%、或至少 95%~100%。化合物可以单独使用或组合使用。

如这里所述的，包含化合物的药物制剂是以治疗上的有效量施用。能调节 MK2 活性的化合物可以选自蛋白、肽、抗体、化学试剂或小分子。如这里所使用的，化合物的“有效量”是足以减少炎症以达到理想的生物学结果的剂量。这样的改善可以通过多种方法检测出，包括检测症状（例如疼痛、肿胀或发红）的那些。例如，用美国风湿病学会 (ACR) 评分来检测类风湿性关节炎中的炎症。ACR 评分定义为触痛关节和肿胀关节什数有 $\geq 20\%$ 、50% 或 70% 改善，加上在下面的 5 项标准中的至少 3 项中有 $\geq 20\%$ 、50% 或 70% 改善：患者疼痛评价、医生和患者的总体评价、患者自述残疾、急性阶段反应物（红细胞沉降速度和 C-反应性蛋白水平）。但是，应当理解，医生能诊断和检测任何疾病中的炎症，并确认使用本发明的方法鉴别出的抗炎药物是否减轻了炎症。

通常，治疗上的有效量会随着对象的年龄、状况、性别和对象的医学状况的严重性而变化。剂量可以由医生决定，并且在必要时调整到适合观察到的治疗效果。施用至少一种能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的化合物的合适剂量可以是 5mg 至 500 mg、50mg 至 250mg、100mg 至 200mg、50mg 至 100mg、15mg 至 85 mg、30mg 至 70mg 和 40mg 至 60mg。这些化合物可以在一次给药中施用，或间隔地（例如每日一次、每周一次或每月一次）施用。剂量方案可以根据蛋白减轻炎症的能力、蛋白的半衰期或患者状况的严重性来进行调整。

通常，组合物是作为团块剂量 (bolus dose) 施用，使这些化合物的循环水平最大化，给药后达到最大的时间长度。团块给药后还可以使用连续输注。

5 通过标准的药理学方法可以确定这样的蛋白或化合物的毒性和治疗效能。可以在细胞培养物中进行实验，确定蛋白或化合物对细胞因子表达或活性的影响。还可以在实验动物中进行实验，例如确定 LD_{50} (使 50% 群体死亡的剂量) 和 ED_{50} (对 50% 群体治疗上有效的剂量)。化合物的毒性作用和治疗作用之间的剂量比是其治疗指数，它可以表达为 LD_{50} / ED_{50} 。能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的表现
10 表现出大治疗指数的化合物 (包括但不限于肽、蛋白、抗体、化学试剂和小分子) 可以在本发明的治疗方法中使用。

从细胞培养测定和动物研究中得到的数据可以用于评价在人体使用时的剂量范围。这样的蛋白和化合物的剂量可以在包括 ED_{50} 值且较少或无毒性的循环浓度的范围内。根据采用的剂量形式和使用的给药
15 途径，剂量可以在该范围内变化。对于能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用的任何化合物，可以按照所述从细胞培养测定初步地估计出治疗上有效的剂量。可以在动物模型中配制剂量来达到包含在细胞培养物中测得的 ID_{50} (即受检蛋白达到症状最大抑制一半时的浓度) 值的循环血浆浓度范围。可以测量在血浆中的水平，例如通过高压液相色谱。通
20 过合适的生物实验可以监视任何特定剂量的效果。

H. 使用细胞的治疗方法

给宿主施用能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的蛋白、肽或抗体的另一种方法是施用能表达这些化合物的细胞。可以用多种方法将表达蛋白、肽或抗体的细胞输送到用于调控炎症的位置。
25 在本发明的一个实施方案中，可以通过靶向输送来施用表达蛋白、肽或抗体的细胞，例如将这样的细胞的样品直接注射进炎症组织的特定位点。细胞可以在介质或基质中输送，所述的介质或基质能部分阻止它们的运动，将细胞定位在目标位点。这样的介质或基质可以是半固体的，例如糊状或凝胶，包括凝胶状聚合物。或者，介质或基质可以
30 是固体、多孔固体的形式，它们允许细胞迁移进固体基质并且将它们保留在那里，同时允许细胞的增殖。在一些实施方案中，宿主细胞包含编码重组 MK2 多肽的第一核酸和编码 MK2 相互作用蛋白 (例如 STS、

HPH2 和 Shc) 的第二核酸。随后可以从宿主细胞中分离出含有 MK2 和至少一种其它蛋白的 MK2 复合物。

I. 在细胞中表达 DNA 的方法

5 可以将编码能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的蛋白、肽和抗体的 DNA 导入到细胞中。该 DNA 编码的蛋白、肽和抗体然后可以在这样的细胞中表达。在本发明的一些实施方案中，为了改变细胞中细胞因子的产量或活性，可以将编码能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用从而调节 MK2 活性的蛋白、肽和抗体的 DNA 分子导入到细胞中。更具体地，可以将编码蛋白、肽或抗体的 DNA 分子导入到细胞中，以
10 减少或抑制细胞因子的产量或活性。

使用重组表达载体（例如嵌合病毒或胶态分散系统）可以输送蛋白、肽或抗体的多核苷酸序列。靶脂质体可以用于多核苷酸序列的治疗性输送。可以用来将 DNA 导入到细胞中的各种病毒载体包括腺病毒、疱疹病毒、痘苗病毒或 RNA 病毒（例如逆转录病毒）。逆转录病毒载体
15 可以是鼠或鸟逆转录病毒的衍生物。可以将单一外源基因插入到其中的逆转录病毒载体的实例包括但不限于：莫洛尼氏鼠白血病毒 (MoMuLV)、哈维小鼠肉瘤病毒 (HaMuSV)、鼠乳腺癌病毒 (MuMTV) 和劳氏肉瘤病毒 (RSV)。许多其它逆转录病毒载体能整合多个基因，例如能编码多顺反子信息的载体或包含多个启动子的载体。所有的这些载体
20 都能给基因转移或整合一个可选择的标记，以便转导的细胞能被鉴别和产生。

由于重组的逆转录病毒是有缺陷的，它们需要含有质粒的辅助细胞系，所述的质粒编码受病毒长末端重复序列内的调节序列控制的逆转录病毒的全部结构序列。这些质粒缺少启动包装机制以识别 RNA 转
25 录产物进行壳体包装的核苷酸序列。缺失包装信号的辅助细胞系包括但不限于，例如 PSI.2、PA317 和 PA12。这些细胞系生产空毒粒，因为没有包装基因组。如果将逆转录病毒载体导入到具有完整包装信号但是结构基因被替换为其它目标基因的细胞中，则可以包装载体且生成载体毒粒。

30 或者，通过常规的磷酸钙转染，可以用编码逆转录病毒结构基因 gag、pol 和 env 的质粒直接转染组织培养物中的第二种细胞。然后用含有目标基因的载体质粒转染这些细胞。得到的细胞将逆转录病毒载

体释放到培养基中，随后载体被导入到合适的细胞中。

5 编码蛋白、肽或抗体的多核苷酸的另一种靶向输送系统是胶态分散系统。胶态分散系统包括大分子复合物、纳米囊、微球、珠和基于脂质的系统，包括水包油乳状液、胶束、混合胶束和脂质体。脂质体是用作输送载体的人工膜囊泡。可以将 RNA、DNA 和完整毒粒包封到水内部并以生物活性形式输送给细胞(参见，例如，Fraley 等，Trends Biochem. Sci., 6: 77 (1981))。使用脂质体载体将基因有效地转移进细胞中的方法是本领域已知的(参见，例如，Mannino 等，Biotechniques, 6: 682 (1988))。脂质体组合物通常包括磷脂类的组合，典型地与类固醇(特别是胆固醇)组合。也可以使用其它的磷脂或脂类。脂质体的物理特征依赖于 pH、离子强度和二价阳离子的存在。

15 在脂质体生产中有用的脂类的实例包括磷脂酰化合物，例如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂类、脑苷脂和神经节苷脂。示例性的磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。

J. 在组织、器官或生物体中表达 DNA 的方法

20 可以将编码能结合 MK2(包括抗体)的蛋白的 DNA 和编码能通过结合 MK2 复合物调节 MK2 活性的蛋白、肽和抗体的 DNA 导入组织、器官或生物体内的细胞。DNA 编码的蛋白、肽或抗体然后可以在组织、器官或生物体的细胞中表达。在本发明的一个实施方案中，为了改变细胞因子在组织、器官或生物体的细胞中的产量或活性，可以将编码蛋白、肽或抗体的 DNA 导入到细胞中。该方法可以用于减少组织、器官或生物体中的炎症。本发明可以用于治疗多种状况，例如克隆氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、迟发型过敏反应、哮喘、系统性红斑狼疮和由于创伤或损伤引起的炎症。

30 在本发明的一个实施方案中，可以将编码能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的蛋白、肽或抗体的 DNA 导向到特定的目标细胞类型中。该细胞类型可以是组织、器官或生物体的组分。通过将目标序列与其它编码特定靶细胞上的受体的配体的基因一起插入到病毒载体，例如该载体现在对某细胞类型是特异性的，这样就可以对某

组织、器官或生物体是特异性的。通过连接例如糖、糖脂或蛋白，可以将逆转录病毒载体变为靶特异性的。导向可以通过使用抗体来完成。本领域的技术人员能够认识到，可以将特异性的多核苷酸序列插入到逆转录病毒基因组中或连接到病毒包膜上，以目标特异性地输送含有蛋白、肽或抗体的多核苷酸的逆转录病毒载体。基于如本领域已知的细胞特异性，脂质体的导向也是可行的。

在本发明的另外一个实施方案中，可以从组织、器官或生物体取出细胞，将编码能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的蛋白、肽或抗体的 DNA 导入到该细胞中，再将该细胞重新导入到组织、器官或生物体中。当输送到目标组织、器官或生物体中时，这些细胞然后会生产蛋白、肽或抗体。通过上述的方法，可以将细胞重新导入到组织、器官或生物体中。

K. 检测和分离 MK2 的方法

与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物可以用于体内或体外检测 MK2 的存在或其量。这包括蛋白、肽、抗体、化学试剂和小分子。通过将 MK2 相互作用蛋白的存在或水平与医学状况相关联，本领域的技术人员可以诊断相关的医学状况。在这里说明了通过这些化合物可以诊断出的医学状况。

这样的检测方法是本领域熟知的，包括 ELISA、放射免疫测定、免疫印迹、Western 印迹、免疫荧光法、免疫沉淀和其它可对比的技术。这些化合物还可以提供在诊断试剂盒中，它整合了这些技术中的一种或多种来检测 MK2。这样的试剂盒可以含有其它组分、包装、说明书或其它的辅助检测 MK2 和使用试剂盒的物质。

当能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用和调节 MK2 活性的化合物要用于诊断目的时，理想的是修饰它们，例如用配体基团（例如生物素）或可检测的标记基团（例如荧光基团、放射性同位素或酶）。如果需要，可以使用常规技术标记它们。合适的标记物包括荧光团、发色团、放射活性的原子、高电子密度的试剂、酶和具有特异性结合配偶体的配体。典型地通过酶的活性来检测它们。例如，辣根过氧化酶通常是通过它将 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 转化成蓝色色素的能力（用分光光度计可以定量）来检测的。其它的合适的结合配偶体包括生物素和抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素、IgG 和蛋白 A，以及许多本

领域已知的受体-配体对。其它的排列和可能性是本领域的普通技术人员能容易地明白的，并且认为是本发明范围内的等同物。

与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物还可以用于在纯化工艺中分离 MK2。在一种工艺中，可以将化合物固定化，例如通过整合进柱或树脂。用化合物结合 MK2，然后转移到能导致释放结合的 MK2 的条件。这样的工艺可以用于商业化生产 MK2。

下面的实施例提供了本发明的多个实施方案。本领域的普通技术人员能够认识到，可以进行许多改进和变化而不脱离本发明的精神和范围。相信这样的改进和变化也在本发明的范围内。实施例不以任何方式限制本发明。应当理解，说明书和权利要求书中的所有数字都被术语“约”修饰，例如作为剂量的微小改变，也被认为在本发明的范围内。

实施例

实施例 1: cDNA 文库的制备

进行酵母双-杂交筛选的方法源自 Clontech 出版的 Pretransformed Matchmaker Libraries User Manual (Palo Alto, California, USA; versions PT3183-1; PR1X299)。

预转化的人骨髓 cDNA 文库购自 Clontech (# HY4053AH)。该 cDNA 文库预转化进酿酒酵母宿主株 Y187 (Clontech) 中。酵母细胞在使用前处于冷冻状态。

酵母报道株 AH109 (Clontech) 中的 DNA-诱饵构建体作为 Y187 酵母的交配配偶体。

实施例 2: MK2-诱饵构建体的制备

为了制备含有结合域 (BD) 的 MK2 构建体，通过定向克隆到 DNA-BD 载体 pGBKT7 (Clontech) 中产生 MK K93R-pGBKT7，生成了编码全长激酶的 MK2 基因片段，该激酶的 ATP 结合袋中的氨基酸赖氨酸 93 已经被诱变为精氨酸。将位点 93 处的赖氨酸转换成精氨酸，以生成无催化活性的激酶形式。更具体地，用 Nde-Xho 消化 pGBKT7 载体，使用琼脂糖凝胶电泳纯化。使用 T4 DNA 连接酶将 MK2 片段连接到 pGBKT7 载体中。通过限制分析鉴别含有插入物的质粒。用 MK2 构建体转化酵母，随后在转化的 AH109 酵母株中确认了 MK2 的表达。

通过对比用 MK2 构建体转化的细胞和用空载体转化的细胞的生长

速度，研究了 MK2 构建体编码的蛋白对宿主细胞的毒性。确认 MK2 构建体无毒性。含有诱饵构建体或空载体的细胞以基本相同的速度和细胞数量生长。

为了分析转录的激活，将 MK2 构建体转化的细胞铺于 SD/-
5 Trp/X- α -Gal (Clontech)、SD/-His/-Trp/X- α -Gal (Clontech) 和
SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal 培养基 (Clontech) 上。结果表明，MK2 蛋白
自身不能激活转录。但是，含有 MK2 诱饵构建体的酵母生成了色氨酸，
这些酵母不生成腺嘌呤或组氨酸。但是在 SD/-Trp/X- α -Gal 培养基上
10 生长的克隆没有显蓝色。克隆在 SD/-His/-Trp/X- α -Gal 或 SD/-Ade/-
Trp/X- α -Gal 培养基上不生长，这表明没有通常的内源报道基因的转
录激活。

实施例 3: 筛选酵母双-杂交文库

在筛选文库中使用的 MK2 是全长的和无催化活性的。使用该无活
性的在 MK2 ATP 结合袋的保守赖氨酸处编码丙氨酸取代、使 MK2 变为
15 无活性形式的突变体 (Kotlyarov et al., Mol Cell Bio 22, 4827-4835
(2002))，因为已知无活性的激酶会更稳定地结合相互作用蛋白，从
而更强地转录激活双杂交报道基因。

将 MK2 构建体转化的酵母菌落接种到 SD/-Trp (Clontech) 培养基
中，在 30°C 过夜，以 250-270 rpm 摇动。次日，测得 OD₆₀₀ 值 > 0.8。
20 1000×g 离心 5 分钟以沉淀细胞，倾倒入上清液，通过涡旋将细胞沉淀
重新悬浮到残余的液体中。

在室温水浴中解冻一份 (约 1.0ml) 冷冻的文库培养物。轻柔涡旋
细胞。得到完整的 MK2 诱饵培养物和 1ml 文库培养物。向培养物中加
入 45 ml 2×YPDA/Kan (酵母提取物、蛋白胨、葡萄糖、腺嘌呤和卡那
25 霉素的混合物; Clontech)，轻微旋动，用 2×YPDA/Kan 将体积调整到
50 ml。在 30°C 轻旋 (30-50 rpm) 细胞孵育过夜。

将细胞转移到无菌离心瓶中，通过在 1000×g 离心 10 分钟进行沉
淀。将沉淀重新悬浮到 50 ml 2×YPDA/Kan 中，然后在 1000×g 离心 10
分钟沉淀细胞。重复该洗涤步骤。随后将细胞重新悬浮到 10 ml
30 0.5×YPDA/Kan 培养基中。

将 200 μ l 交配混合物铺于约 50 个大 (150 mm) SD/-His/-Leu/
-Trp 平板 (Clontech) 上。在 30°C 孵育平板，菌落侧朝下，直到菌落出

现在平板上。对在 SD/-Leu(Clontech)、SD/-Trp 和 SD/-Leu/-Trp (Clontech) 平板上生长的克隆评分。单倍体和二倍体细胞能在 SD/-Leu 或 SD/-Trp 培养基上生长。只有二倍体细胞能在 SD/-Leu/-Trp 培养基上生长。确定的交配效率为 5.4%。

- 5 将在含有 SD/-His/-Leu/-Trp X- α -Gal 培养基的平板上生长的菌落在 SD/-His/-Leu/-Trp X- α -Gal 平板上重新划线以检验表型。接着，在更严格的含有 X- α -GAL 的 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板 (Clontech) 上筛选克隆。以栅格方式将阳性菌落在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (Clontech) 上重新划线，产生主平板。从这些主平板制备
- 10 酵母的 DNA 预备品和甘油储备品。

实施例 4：推定的阳性克隆的分析

- YEASTMAKER™ 酵母质粒分离试剂盒 (Clontech ; #K1611-1) 提供了从酵母分离质粒的试剂和工具。从已经在主平板上划线的各阳性菌落得到酵母，并重新悬浮到 96 孔平板中的 50 μ l Tris EDTA。向每个
- 15 孔中加入 10 μ l 裂解酶。在 37 $^{\circ}$ C 孵育平板 1 小时，然后加入 20 μ l 20% SDS。使用 Qiagen turbo prep (Qiagen, Valencia, California, USA) 纯化 DNA。使用 Advantage 2 PCR 酶 (Clontech ; # K1910-1) PCR 扩增样品。通过测序鉴别插入物。

实施例 5：阳性克隆的分析

- 20 将独立序列转化到细菌 (DH5 α) 中，随后从其中分离 DNA。接着，将 DNA 转化到酵母株 AH109 中。将几种诱饵 (MK2、无催化活性的 MK2 K93R、空载体 pGBKT7、TPL2、p53 和核纤层蛋白 (Clontech)) 转化到酵母株 Y187 中。将 AH109 中的转化的每一个独立序列株与用三种诱饵中的每一种转化的 Y187 酵母进行交配。独立克隆能与 MK2 和 MK2
- 25 K93R、但不能与空载体 pGBKT7、TPL2、p53 或核纤层蛋白相互作用，通过它们在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 上的生长测定和在 SD/-Leu/-Trp X- α -GAL 上的蓝色，将它们鉴别为包含编码特异性的 MK2 相互作用蛋白的 DNA 插入物的克隆 (图 9A)。MK2 相互作用蛋白能以基本相同的亲和力结合野生型 MK2 和 MK2 K93R，这表明 MK2 结合不是无活性的
- 30 激酶突变体 MK2 K93R 的伪迹。独立 DNA 序列编码的蛋白的特征在于“与 smoothelin 相似” (STS)。编码该蛋白的 cDNA 序列提供在图 1 和 SEQ ID NO:1 中，氨基酸序列提供在图 4 和 SEQ ID NO:4 中。

独立克隆编码的另一种蛋白是人多同源异形体 2 (HPH2)。编码该蛋白的 cDNA 序列供在图 2 和 SEQ ID NO: 2 中, 氨基酸序列提供在图 5 和 SEQ ID NO: 5 中。HPH2 具有不育 α 基序 (SAM) 蛋白相互作用域。

5 分离的独立 DNA 序列编码的另一种蛋白是 src 同源性和胶原蛋白 (Shc)。编码该蛋白的 cDNA 序列供在图 3 和 SEQ ID NO: 3 中, 氨基酸序列提供在图 6 和 SEQ ID NO: 6 中。Shc (p66 Shc A) 的最长异构体具有 N 端 CH2 域, 在蛋白 C 端是 PTB、CH1 和 SH2 域。

实施例 6: MK2 相互作用域的描绘

为了描绘与 Shc A、HPH2 和 STS 相互作用所需的 MK2 域, 使用了
10 几种 MK2 缺失突变体。检验的 MK2 突变体包括 MK2 ∇ N (MK2 氨基酸 41-400)、MK2 ∇ C (MK2 氨基酸 1-370) 和 MK2Cat (MK2 催化域氨基酸 41-338)。MK2 ∇ N 具有富含脯氨酸的 N-端缺失, MK2 ∇ C 具有 MK2 核定位信号 (NLS) 和 p38 结合位点缺失, MK2Cat 具有 N 端富含脯氨酸的域和 C 端自动抑制域、核输出信号 (NES) 和 NLS 缺失。
15 Shc A 同样好地与全长 MK2、MK2 ∇ C 和 MK2Cat 相互作用。但是, 与 MK2 ∇ N 的相互作用几乎不能检测出。与 Shc A 的相互作用方法表明, Shc A 与 MK2 催化域最低限度地相互作用, MK2 N-端的缺失会诱导构型变化, 所以 Shc A 不再有效地结合 MK2。

HPH2 以基本相同的亲和力结合全长 MK2、MK2 ∇ N 和 MK2 ∇ C。但
20 是, 与 MK2Cat 的相互作用不那么明显。因此, HPH2 似乎需要结合在 MK2 的 N-或 C-端, 而 MK2 催化域单独表达时不能促进 HPH2 与 MK2 以可比较的水平结合。

类似地, smoothelin 结合 MK2 的亲和力比 Shc A 或 HPH2 更高, 如在酵母的生长和颜色测定中所证实。另外, 类似地, smoothelin 以
25 基本相同的亲和力结合 MK2、MK2 ∇ N、MK2 ∇ C 和 MK2Cat 中的每一个, 这表明 MK2 中的多个位点与该蛋白相互作用。

实施例 7: MK2 与哺乳动物细胞的 Shc A 和 HPH2 共免疫沉淀

将 V5-标记的 Shc 和 MYC-标记的 MK2 在 293T 细胞中共表达, 如图 10A 所示。用或不用 10 μ g/ml 茴香霉素刺激细胞 30 分钟。使用抗 V5
30 或 Myc 的抗体的细胞裂解物的 Western 印迹表明, V5-标记的 Shc 和 MYC-标记的 MK2 蛋白都有表达。用抗-V5 抗体免疫沉淀细胞裂解物。免疫沉淀物通过 SDS PAGE 分辨, 并用抗-MYC 抗体进行免疫印迹。抗

-MYC 抗体能结合免疫印迹, 这表明 MYC-标记的 MK2 与 V5-标记的 Shc 共免疫沉淀。这暗示着 MK2 和 Shc 之间的相互作用。

在类似的实验中, 使用抗-HA 抗体的共免疫沉淀和随后的抗-Myc 抗体的免疫印迹表明, MK2 与 HPH2 和 p38 共免疫沉淀(图 10B)。HA-
5 标记的 p38、HA-标记的 HPH2 和 Myc-标记的 MK2 都在 293T 细胞中表达, 如 Western 印迹所示。

共免疫沉淀可以用于检测两个蛋白的结合, 或确定两个蛋白之间的结合的结果, 如在其它方法(例如 Y2H 系统)中所发现的。

实施例 8: 结合蛋白对 MK2 激活的影响

10 将 HA-标记的 MK2 相互作用蛋白(例如 Shc)和 MYC-标记的 MK2 在 293T 细胞中共表达。制备细胞裂解物, 并通过 SDS PAGE 分辨。随后用 Myc 和 HA 抗体进行免疫印迹, 检测 MYC-标记的 MK2 和 HA-相互作用蛋白, 这会确认这些蛋白的表达。由于 MK2 的激活包括 MK2 的磷酸化, 抗体的免疫印迹会检测出磷酸化的 MK2(例如, 抗-磷酸 MK2 苏氨酸 334
15 (p334)), 这会决定 MK2 的激活状态。与单独表达 MK2 时的 MK2 p334 的量相比, 当与 MK2 激活剂共表达时的 MK2 p334 的量的差异会指示在存在 MK2 相互作用蛋白的情况下的改变的 MK2 活性。

实施例 9: MK2 相互作用蛋白对 TNF 生物合成的影响

20 将两个空载体构建体在 RAW 264.7 巨噬细胞中共表达, 建立 TNF- α 生物合成的基础水平, 如通过 ELISA 检测到的(图 11)。用或不用脂多糖(LPS)刺激细胞, 以刺激 MK2 的催化活性。检测 MK2、p38 或 Shc 与空载体共表达的细胞中的 TNF- α 表达水平, 并将水平与用单独载体发现的基础水平作对比。当细胞共表达 p38 和 Shc 时, TNF- α 表达水平比对照组检测到的更高。类似地, Shc 和 MK2 的共表达也会导致 TNF-
25 α 水平的升高。

实施例 10: MK2 对 MK2 相互作用蛋白的磷酸化状态的影响

30 将 HA-标记的 MK2 相互作用蛋白在 293T 细胞中表达。制备细胞裂解物, 并用抗-HA 抗体免疫沉淀。免疫沉淀物用于体外激酶实验中, 其中加入重组 MK2 作为激酶。依次用 SDS PAGE 和磷酸成像检测 MK2 相互作用蛋白的磷酸化。MK2 的结合或相互作用蛋白在存在 MK2 情况下的磷酸化和 MK2 相互作用蛋白在无 MK2 情况下的磷酸化的减少或无磷酸化会指示 MK2 对 MK2 相互作用蛋白的磷酸化。MK2 相互作用蛋白可能是

或不是 MK2 的底物。

实施例 11: 使用蛋白质组学方法检测 MK2 相互作用蛋白

可以用蛋白质组学方法鉴别 MK2 相互作用蛋白。将野生型 (+/+) 或 MK2 缺陷型 (-/-) 细胞铺平板, 并用 ^{33}P 标记。激活 MK2 30 分钟, 然后制备全细胞裂解物, 使用二维凝胶电泳分析。对比凝胶, 鉴别有差别地磷酸化的蛋白。图 12A 显示了有差别地磷酸化的蛋白(箭头), 其等电点为 5.4。在 MK2 +/+ 细胞中没有磷酸化, 可能是由于蛋白迁移中的磷酸化依赖性的改变。图 12B 显示了同一区域的银染色, 它显示了
5 许多可分辨的蛋白。

10 实施例 12: 当在 HeLa 细胞中与 Shc A 共表达时激活 MK2

检测了与 Shc A 共表达时 MK2 的激活状态。Hsp 27 是 MK2 的生理学底物。HeLa 细胞中的内源性的 HSP 27 的磷酸化是对 MK2 的反应, 因此, 可以用来确定 MK2 活性。用单独载体、或载体和 V5-Shc A 或 Myc-MK2 (作为对照) 转染 HeLa 细胞。平行地, 用 V5-Shc A 和 Myc-MK2 共转染细胞。表达后, 不用或用茴香霉素刺激细胞 30 分钟以激活
15 MK2。随后用针对磷酸化的 Hsp 27 (pHsp 27) 的抗-磷酸肽特异性抗体进行的免疫印迹表明, 刺激时增加了 pHsp 27。随着外源性 Myc-MK2 的表达, 未刺激时的细胞中的基础 pHsp 27 水平也有升高(图 13A)。在 Shc A 或载体对照表达细胞中没有观察到这样的基础磷酸化的增
20 加。使用密度测定法对这些结果的定量表明, 随着 Myc-MK2 的表达观察到的基础 pHsp 27 的增加是空载体或 V5-Shc A 的 1.5-2 倍。当 Myc-MK2 与 V5-Shc A 共表达时, 基础 pHsp 27 的水平有进一步的提高。定量表明该提高比单独表达 Myc-MK2 时检测到的水平超出 3 倍(图 13B)。如 293T 细胞所显示的, MK2 水平随着 Shc A 的共表达而增加,
25 这进一步说明了 MK2 和 Shc A 之间的相互作用。观察到的基础 pHsp 27 的增加很可能反映了升高的 MK2 活性和升高的 MK2 蛋白水平。当用 MK2 水平标准化时, 表明基础 pHsp 27 增加了 2 至 3 倍(图 13C)。认为该增加反映了 Shc A 的共表达对 MK2 的激活。

共表达 p66 Shc A 观察到升高的 MK2 活性。HeLa 细胞中内源性的
30 Hsp 27 的磷酸化是对 MK2 活性的反应。与 MK2-p66 Shc A 共表达观察到增加的 pHsp 27, 这表明 p66 Shc A 结合能激活 MK2。在 RAW 264.7 细胞中共表达 MK2-p66 Shc A 时观察到的 TNF- α 水平的升高确认了 Shc

A 共表达能激活 MK2。用 p66 Shc A 激活 MK2 会导致 MK2 通过与 Shc A 结合定位且保留在胞质溶胶中。胞质溶胶定位会接着促进 MK2 向细胞质底物（例如 Hsp 27 和 TNF- α mRNA）的接近。或者，MK2 会结合促进 MK2 细胞质定位的胞质溶胶 Shc，在此处它就变得更活化了。

5 实施例 13: 在 RAW264.7 细胞中与 Shc A 共表达时激活 MK2

如 HeLa 细胞中的 pHsp 27 水平测定所证实的，当与 Shc A 共表达时会激活 MK2。为了进一步证实与 Shc A 的缔合会激活 MK2，针对有 MK2 和 Shc A 存在的情况，测定了从 RAW264.7 细胞分泌出的 TNF 蛋白。从来自缺失 MK2 的小鼠的细胞得到的数据表明，LPS 会引起 TNF- α 生物合成的 90% 减少。后续的实验已经证实，需要催化活性的 MK2 来恢复这些细胞中的 TNF 生物合成，由此认为 MK2 酶促活性对于 TNF- α 生物合成是必需的。用单独载体转染 RAW264.7 细胞，或者用载体和 V5-Shc A 或 Myc-MK2 共转染作为对照。平行地，用 V5-Shc A 和 Myc-MK2 共转染细胞。表达后，不用或用 LPS 刺激细胞 30 分钟激活 MK2。定量的 western 印迹分析表明，Myc-MK2 和 V5-Shc A 都在 RAW264.7 细胞中表达。与在 293T 和 HeLa 细胞中共表达相反，当在 RAW264.7 细胞中共表达时，MK2 和 Shc A 的水平都降低。该降低不能反应蛋白水平的总体降低，因为在每道上加载了等量的蛋白，如使用肌动蛋白特异性抗体所显示的（图 14A）。

20 TNF 的 ELISA 实验表明，LPS 刺激会使 TNF- α 的分泌增加 8 倍，Myc-MK2 或 V5-Shc A 的单独表达不能加强这些细胞中的 TNF 生物合成。相反，当 MK2 和 Shc A 共表达时，刺激后的 TNF- α 生物合成增加 1.5 倍（图 14B）。认为 TNF 生物合成的增加反映了 MK2 活性的增加，但是不能反映 MK2 的表达，因为当与 Shc A 共表达时的 MK2 蛋白水平低于在单独表达 MK2 的细胞中观察到的。

25 实施例 14: MK2 在体外磷酸化 Shc A

在氧化应激下，P66 Shc 在 CH2 域中的丝氨酸 36 处被磷酸化。N-端至 S36，丝氨酸位于 Cam 激酶 II 共有序列：RXXS 中的位点 17 (S17) 处。图 15A 显示了 Shc A 蛋白的略图，它包括蛋白中的多个磷酸化位点。已经证实 RXXS 基序是 MK2 的底物，尽管它不含有经常在 MK2 共有基序的保守的精氨酸-2 位置发现的疏水氨基酸。为了确定 Shc A 是否是 MK2 的底物，将 V5-Shc A 在 293T 细胞中表达。表达后，使用抗-V5

抗体免疫沉淀 Shc A。免疫沉淀物随后用于体外激酶测定，其中外源地加入了激活的重组 MK2。用载体转染的对照细胞在 66-kDa 表现出较低的磷酸化水平，很可能是由于抗-V5 抗体免疫沉淀了 293T 细胞的内源性蛋白（它是 MK2 的弱底物）。只有 Shc A 转染的细胞在 66-kDa 表现出较强的磷酸化水平，这表明 Shc A 是 MK2 的体外底物。Coomassie 染色和使用抗-V5 抗体的免疫印迹表明 Shc A 在 Shc A 转染的细胞中有表达(图 16B)。

如图 15B 所示，MK2 能体外地磷酸化 p66 Shc A。MK2 可以在 p66 Shc A 调节的应激激活途径中起作用。尽管 Shc A 的 66 kDa 异构体能结合被激活的细胞表面受体，它的结合也不能激活 Ras MAPK 途径。由于 p66 Shc A 未被普遍表达，认为其细胞类型和组织特异性的表达通过其选择性的表达方式选择性地调节 Ras MAPK 途径的激活。另外，p66 Shc A 异构体在 p53 的下游起作用，调节细胞对氧化应激的反应 (Trinei 等, *Oncogene* 21 (24): 3872-8 (2002))。氧化应激会激活 P38-MK2 途径，将小热休克蛋白磷酸化，由此调节微丝对应激的反应 (Huot 等, *Circ Res.* 80 (3): 383-92. 1997)。p38 和 MK2 参与由氧化应激引起的 p53 磷酸化 (She Q. B. 等, *J Biol. Chem.* 7; 275 (27): 20444-9 (2000); She Q. B. 等, *Oncogene* 21 (10): 1580-9 (2002))。JNK 和 ERK 参与丝氨酸磷酸化 p66。本申请中陈述的数据支持了 MK2 在应激激活的 p66 磷酸化中的作用，如图 16 所示。

实施例 15: 在 MK2^{-/-}细胞中降低磷酸 Akt 和磷酸 FKHR-L1 的水平

从敲除了 p66Shc A 的动物得到数据已经证实，p66 调节细胞对氧化应激的反应，包括胞内 ROS 的生成和细胞凋亡，这些反应需要蛋白中 S36 处的磷酸化。来自 p66Shc A^{-/-}动物的细胞具有降低了水平的胞内自由基，与野生型同窝幼仔相比对细胞凋亡诱导的应激有抗性。另外，p66Shc A^{-/-}动物对 paraquat（一种能产生氧化剂的化合物）也有抗性，还表现出延长的寿命。p66 Shc^{-/-}MEF 中的氧化应激（例如紫外线或 H₂O₂）引起的 AKT 和 FKHR-L1 的磷酸化有所减少。FKHR-L1 磷酸化的减少与 FKHR-L1 活性的升高有关，因为该转录因子在其去磷酸化形式仍然有作用。具有激活的 FKHR-L1 的细胞对细胞凋亡有抗性，这与该转录因子在调节几种抗氧化剂酶（包括超氧化物歧化酶和过氧化氢酶）的表达中的作用相符。

MK2 在细胞对应激的反应中磷酸化和调节 p66Shc A 中的作用表明, 与野生型细胞相比, 缺失 MK2 的细胞应当表现出降低的氧化应激引起的磷酸 (p) -AKT 和磷酸 (p) -FKHR-L1 水平。为了验证该预测, 在 MK2^{-/-}和^{+/+} MEF 中测定了 H₂O₂ 诱导的 p-AKT 和 p-FKHR-L1 水平。定量的 western 印迹分析表明, 在 MK2^{-/-} MEF 中的 p-AKT 和 p-FKHR-L1 水平都比在^{+/+} MEF 中有所降低, 这表明 MK2^{-/-}细胞中的胞内 ROS 水平有所降低(图 17)。

实施例 16: 筛选抗炎药物

1. 用于筛选药物的酵母 2-杂交系统

10 用能结合 MK2 的蛋白鉴别抗炎药物, 包括能用于治疗或预防炎症的小分子、肽、化学试剂和抗体。

使用这里所述的酵母 2-杂交系统鉴别 MK2-相互作用蛋白。然后通过一个或多个这里提供的测定或本领域已知的测定研究 MK2-相互作用蛋白对 MK2 活性的影响。例如, MK2 相互作用蛋白会提高 MK2 活性, 15 例如, 如通过 MK2 激酶活性或 TNF- α 生物合成所测定的; 抑制 MK2 活性; 或对 MK2 活性无影响。理想地用能提高 MK2 活性的 MK2 相互作用蛋白作为筛选抗炎药物的备选品。

将显示出 MK2 和 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用(如上所述, 它能提高 MK2 活性)的阳性酵母克隆在合适的选择平板上划线, 其次 20 数与药物备选品或要测试的受检化合物的数量相同。如预期的, 每一个划线的菌落对 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用都是阳性的, 如通过颜色和生长测定所证实的。随后使每一个菌落接触不同的药物备选品, 测试对 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用的影响。将能抑制 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用(如通过合适培养基上的菌落的颜 25 色和/或生长的减少所证实的)的药物备选品鉴定为潜在的治疗或预防炎症的备选品。

可以用相同的测定, 例如, 用于鉴别能促进 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用的药物备选品, 其中相互作用蛋白抑制 MK2 活性。例如, 可以将显示出 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用(如一个或多个 30 个这里提供的测定所证实的, 它至少部分地抑制 MK2 活性)的阳性酵母菌落在合适的培养基上划线。随后使每一个阳性克隆的菌落接触潜在的药物备选品或受检化合物。能在酵母特异性测定中产生这里所述

的较强生长和颜色的药物备选品是促进 MK2 和 MK2 相互作用蛋白之间的相互作用（其中相互作用蛋白抑制 MK2 活性）的潜在备选品。

2. 用于筛选药物的体外重构实验

5 体外重构实验可以用于鉴别能阻断 MK2 活性或阻断 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用（其中该蛋白增强 MK2 活性）的抗炎药物。

因此，体外重构系统还可以用于形成包含 MK2 和至少一种 MK2 相互作用蛋白的蛋白复合物，其中这样的复合物随后可以用于鉴别能调节炎症的受检化合物。受检化合物对炎症的影响可以通过确定该受检化合物抑制或促进复合物的形成来验证，或测试其对 MK2 活性的影响。
10 例如，将蛋白复合物与受检化合物接触之前和之后，可以测量包含 MK2 和相互作用蛋白的蛋白复合物的量。能使蛋白复合物的量相对于没有受检化合物时的量有所减少的受检化合物具有抗炎性。然而，能使蛋白复合物的量相对于没有受检化合物时的量有所增加的受检化合物具有促炎性。

15 例如，使用体外转录-翻译系统（例如 Promega 供应的兔网状细胞系统）合成 MK2。首先在一个或多个这里提供的测定中测试体外翻译的 MK2 的活性。随后在合适的条件下在合适的时间段内将各种药物备选品加入到翻译的 MK2 中，测试与潜在的药物备选品接触后的 MK2 活性。将能抑制或减少 MK2 活性的备选品鉴别为潜在的抗炎药物。还可以进
20 一步在炎症的细胞和动物模型中体外地验证这些药物对炎症和参与炎症的各种途径的效果。

类似地，体外重构系统还可以用于鉴别能抑制 MK2 和相互作用蛋白之间的相互作用的药物，其中该相互作用蛋白刺激 MK2 活性。例如，将包含体外翻译的 MK2 和相互作用蛋白（如通过 Y2H 系统或共免疫沉淀测定所鉴别的）组合物用潜在的药物备选品处理。将能抑制 MK2 和
25 相互作用蛋白之间的相互作用的备选品鉴别为潜在的抗炎药物。随后在细胞和动物模型中体内地测试这些药物。除了体外翻译的蛋白外，纯化的蛋白也可以用在鉴别抗炎药物的体外重构实验中。

实施例 17: 与炎症相关的状况的治疗

30 可以给患有与炎症相关的状况（如表 1）的患者施用能与 MK2 或 MK2 复合物中的至少一种相互作用的化合物（例如蛋白、肽、抗体、化学试剂和小分子）。患者服用一次或间隔（例如每日一次）服用该组合

物，他们的状况有所改善。例如，炎症有所减轻。这表明，本发明的组合物可以用于治疗与炎症相关的疾病。

表 1: 能与 MK2 或 MK2 复合物相互作用的化合物的施用

患者	状况	给药途径	剂量	剂量频率	预测结果
1	炎性肠病	皮下	25 mg	每日一次	炎症减少
2	"	"	50 mg	"	"
3	"	"	50 mg	每周一次	"
4	"	"	50 mg	每月一次	"
5	"	直肠	50 mg	每日一次	"
6	"	"	50 mg	每周一次	"
7	"	"	50 mg	每月一次	"
8	"	肌肉内	25 mg	每日一次	"
9	"	"	50 mg	"	"
10	"	"	50 mg	每周一次	"
11	"	"	50 mg	每月一次	"
12	"	静脉内	50 mg	每周一次	"
13	克隆氏病	皮下	50 mg	每日一次	"
14	"	"	50 mg	每周一次	"
15	"	"	50 mg	每月一次	"
16	"	直肠	50 mg	每日一次	"
17	"	"	50 mg	每周一次	"
18	"	"	50 mg	每月一次	"
19	"	肌肉内	50 mg	每日一次	"
20	"	静脉内	50 mg	每周一次	"
21	类风湿性关节炎	皮下	50 mg	每日一次	"
22	"	"	50 mg	每周一次	"
23	"	肌肉内	50 mg	每日一次	"
24	"	"	50 mg	每周一次	"
25	"	静脉内	50 mg	每周一次	"

5

根据在说明书中引用的在这里引作参考的参考文献的教导，完全能彻底地理解说明书。说明书中的实施方案提供了对本发明的实施方案的解释，而不应理解为限制本发明的范围。本领域的技术人员能够容易地认识到，许多其它实施方案也被包括在本发明中。说明书中的所有引用的文献、专利申请和专利以及由获取号或数据库参考编号鉴别的序列都整体引作参考。如果引作参考的材料与本说明书矛盾或不

10

一致，则以本说明书为准。这里对任何参考文献的引用都不能表明该参考文献是本发明的现有技术。

如本领域的技术人员所明白的，可以作出本发明的许多改进和变化而不背离其精神和范围。这里所述的特定实施方案只是作为例子来提供，而不是以任何方式进行限制。除非另有说明，在说明书（包括权利要求书）中使用的表达成分的量、细胞培养物、治疗状况等的所有数字在任何情况下都应当理解为被术语“约”修饰。因此，除非另有相反的说明，数字参数都是约数，且可以根据本发明想要得到的理想性质而变化。除非另有说明，一系列元素前的术语“至少”应当理解为是指系列中的每一元素。本领域的技术人员能认识到或仅仅使用常规实验就能确定许多与这里所述的本发明的特定实施方案等同的方案。这样的等同物也应当包括在本申请的权利要求书中。

<110> Lin, Lih-Ling
Yannoni, Yvonne

<120> MK2 相互作用蛋白

<130> 08702-0097-00304

<150> USSN 60/400,044

<151> 2002-08-02

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3312

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

cccacgcgtc cgggggacgg ttgctgagcg ggcctgggac agcgggtcgc ggcacctccc    60
gctgcgcgt gtctaatecg tctgtcgggt cccgaaagag ctaagccgag cctgcgccgg    120
acgggtgggc tggactgaga gaattctctg agctggtgac aggtgccaca ggcactgggg    180
atctcaccag aaaggaaccg acggagctag gggccagcga gatggcggac gaggccttag    240
ctgggctgga tgaggagacc cttcgggaagc tgctggaggt cacagcagat ctggcagagc    300
ggcggcgcac ccgctcagcc atccgggaac tgcagcggca ggagctggag cgcgaggagg    360
aggccctggc atccaagcgt ttcctgccc agcggcagga caacaaggag aactggctgc    420
actctcagca gcgggaagct gagcagcggg ctgcctggc acggctggca gggcagctgg    480
agtccatgaa cgatgtggag gaattgactg cactgttgcg aagcctggt gagtatgagg    540
agcgaagct gatccgagct gccatccgcc gtgtacgggc tcaggagatt gaggctgcca    600
ccttggetgg gaggttgtac agcgggcgct ccaacagtgg ctcaagagag gacagcaagg    660
ggctagcggc acacaggetg gaacagtgtg aggtgccaga gcgagaggaa caggaacagc    720
aggcagaggt ttcaaagcca acccccaccc ctgaaggcac cagccaggat gtgaccacag    780

```

tgacactcct gctgcgagcc ccacctggga geacatccag ctcacctgcc tcaccagca	840
gttcaaccac cctgcctct cctgagcctc cattggagcc tgccgaggcc cagtgcctta	900
cagctgaggt tccaggcagc ccagagccac cccccagccc acccaagacc accagccctg	960
agcctcagga gtctccaacg ctccccagca ctgagggcca ggtgggtcaac aagcttctgt	1020
ctggcccaaa agagaccct gctgcccaga gcccaccag aggcccctct gacaccaaga	1080
gagcagacgt ggctggacc cgacctgcc aacgctcct gtgggtgctc agccccgcc	1140
aaccagccca gaaccgagag tccaccccc ttgccagcgg accttctca ttccagcggg	1200
ctggetctgt gcgggatcgt gtccacaagt tcacatctga ttctctatg gctgctagc	1260
tccaggatgg cacaccccag gctgccctaa gtcccctgac ccccgcaagg ctctgggcc	1320
cctccctcac cagcaccac cctgectct cctecagcgg ctctctctct cggggccca	1380
gtgatactc ctcccggttc agcaaggagc aacgaggagt agcccagccc ctggcccagc	1440
ttcgaagctg ccccaggag gagggccca gggggcggg cttggctgct aggcccctg	1500
aaaacagagc agggggcct gtggcacgtt cagaggagcc tgggtccccg ctcccgtgg	1560
ccgtcggcac tgccagcca gggggcagta tgaagaccac attcaccatc gagatcaagg	1620
acggccgtgg ccaggcctc acaggccggg tctgctgcc cacaggcaac cagaggcag	1680
aactgacact ggggtgcgg gcgccccga cctactcag caccagtagt ggggcaaga	1740
gcaccatcac ccgtgtcaac agccctggga ccctggctcg gctgggcagt gtcactcatg	1800
tcaccagctt cagccatgcc cccccagta gccgaggagg ctgcagcatc aagatggaac	1860
cagagccagc agagcctctc gctgcagcag tggaaagcgc caatgggct gagcagacc	1920
gagtgaacaa agcaccagaa gggcggagcc ctctgagcgc tgaggagctg atgactattg	1980
aggatgaagg agtcttgac aagatgctgg atcagagcac ggactttgaa gageggaagc	2040
tcatecgggc tgcacttctg gagctccgac aaaggaagag agaccagcgg gacaaggagc	2100
gggaacggcg gctgcaggag gcacggggcc ggcagggga ggggcgcggc aacacagcca	2160
ctgagaccac cagaggcac agccagcggg cagctgatgg ctctgctgtc agcactgtta	2220

ccaagactga ggggctcgtc cactccaatg atggcacacg gacggcccgc accaccacag	2280
tggagtcgag tttcgtgagg cgctcggaga atggcagtgg cagcaccatg atgcaaacca	2340
agaccttctc ctcttcctcc tcatccaaga agatgggcag catcttcgac cgcgaggacc	2400
aggccagccc acgggcccgc agcctggcgg cgctcgagaa acggcaggcc gagaagaaga	2460
aagagctgat gaaggcgcag agtctgccc agacctcagc ctcccaggcg cgcaaggcca	2520
tgattgagaa gctggagaag gagggcgcgg ccggcagccc tggcggacce cgcgcagccc	2580
tgcagcgatc caccagcttc ggggtcccca acgccaacag catcaagcag atgctgctgg	2640
actggtgtcg agccaagact cgcggtacg agcaagtga catccagaac ttctctcca	2700
gctggagtga tgggatggcc ttctgtccc tggtcacaa cttcttcctt gaggccttcg	2760
actatgggca gcttagccct cagaaccgac gccagaactt cgaggctggc ttctcatctg	2820
cggagaccca tgcggactgc ccgcagctcc tggatacaga ggacatggtg cgcttcgag	2880
agcctgactg gaagtgcgtg tacacgtaca tccaggaatt ctaccgctgt ctggtccaga	2940
aggggctggt aaaaacaaa aagtcctaac ccctgctcgg ggccccacgg atgctggtgg	3000
actgtgtgcc cctggtggag gtggacgaca tgatgatcat gggcaagaag cctgacccca	3060
agtgtgtctt cacctatgtg cagtcctctt acaaccacct gcgacgccac gaactgcgcc	3120
tgcgcggcaa gaatgtctag cctgcccgcc cgcattggcca gccagtggca agtgcgcc	3180
cccactctcc gggcaccgtc tctgcctgt gcgtccgcc accgctgcc tgtctgttgc	3240
gacacctcc cccccacata cacacgcagc gttttgataa attattggtt ttcaacgaaa	3300
aaaaaaaaaa aa	3312
<210> 2	
<211> 2555	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 2	
ggcgccgcat gtgtctccgc ggcggctgca gccctcgagc gcccgccgc gcgccccaac	60
cccggccgcc gcccgccctc ccgccccggc ctcgcgccc cgtcccgcc tcgcgccccg	120

gccccttt gttgacccg gccagccgt gcggtcggat gcgccggc agccccgggc 180
cccggctcgg aggcctcccg ggcgagagga ggcggcccgc cggccgggac cccgcgcgag 240
tcggccccgg ccaggggctg cgtagccccg cccggccagg cccagccgcc tggacagaga 300
cagggcaggg cattgttcat gcactgaccg acctcagcat ccccggcatg acctcaggga 360
acggaaacte tgcctccagc atcgccggca ctgccccca gaatggtgag aataaacacc 420
cacagcccat tgtgaaacce caaatcctga cgcatttat cgaagggtt gtgatccagg 480
agggggcgga cgttcccg tgggacgctc gtctgctggt ggggaatctc aagaagaagt 540
atgcacaggg gttcctgect gagaaactc cacagcagga tcacaccacc accactgact 600
cggagatgga ggagccctat ctgcaagaat ccaaagagga ggggtgctcc ctcaaacca 660
agtgtgaget ctgtggccgg gtggactttg cctataagtt caagcgttcc aagecttct 720
gttccatggc ttgtgcaaag aggtacaacg tgggatgcac caaacgggtg ggacttttcc 780
actcagaccg gagcaagctg cagaaggeag gagctgcgac ccacaaccgc cgtcgccag 840
caaagccagt ctgccaccac ttaccaagga taccaagaag cagccaacag gcactgtgcc 900
cctttcggtt actgctgctt tgcgtaaac acagccagga agactccagc cgttgctcag 960
ataactcaag ctatgaggaa ccttgtcac ccatctcagc cagctcatct acttccccc 1020
gcgacaaggc cagcgggacc tggagctccc cgacatgcat atgcgggacc tggtaggcat 1080
gggacaccac ttctgcca gtgagccacc aagtgaatgt agaagacgct tacgaattca 1140
tcgctctct gccagctgc caggagatag cagaggaatt ccgtgccag gaaatcgac 1200
ggcaagccct gctgctgctc aaggaggacc acctgatgag cgttatgaac atcaagetgg 1260
ggccccccct gaagatctac gcccgcatca gcatgctcaa ggactcctag ggtggtgga 1320
accaggatte tggcccaggc cgcctctcc cgaactgagc gagccagaca gacattcctg 1380
aggggcccag aatggcggc gttggagggc aggggctctc cctaggggca tagctggtga 1440
ggaggctctg gcacctctc catggctctc aggggccttt catttctgtg ggaggggcag 1500
agaggtaggt ggacagaag atggggcttt atgctttaa atattgatag cactgcttc 1560

ctccaaagtc ccaatactct agceccgctc tcttcccctc tttctgtccc ccattttcca 1620
 gggggtatat ggtcagggtc cccaacctg agttggttac ttcaaggga gccagcaggc 1680
 ctggatggag gcctagaaag cccttgcctt ccttctccc acttctttct ccaggcctgg 1740
 ttaactcttc cgttgcagc ttctcccctc tcagcctggt tctgcagcag ccagggttct 1800
 cccccctaca ccctctgcag gtggagagag agaagctggg ccagccgcg gtgcctgctg 1860
 gccaaagcgc cttaacgctg tgtgtatgac tgtgtgactg tgtgggagcc tggactgaca 1920
 gataggccaa ggctactct ctggcatctc caggtgtttt gtagcaaaca gccacttagt 1980
 gctttgtcct ggactccact cagcctcagg atggggaata gccagaatg gcagcctcag 2040
 cgcagaggca aggtcagaaa gagacggcgc ttcagagttt cctttccaga caccctccc 2100
 cgcactgtga agttcccctg accgccctcc tggttcaca agagcattaa gaaagctgcg 2160
 gtggtctgag caacatagcc cagacgtgga gcctcctggc ctgcctgccc gccaccctg 2220
 ggagtccagt ggtgaggctc agagaacttc taaggggaaa gaacagctgg agtttctggt 2280
 gatgtgaaga aggcagctct tggcctccca ctcccactc tctttgcta taaatcttcc 2340
 tagcagcaat ttgagctacc tgaggaggag gcagggcaga agggcaaggg cctgcctctg 2400
 acctgccgtg tctttgcag gaaggagta ggcacctttc tgagcttatt ctattcccca 2460
 cccacacccc caggcagggt tggaaatgaa ggactttttt aacctttgtt ttgtttttta 2520
 aaaataaatc tgtaaaatct gaaaaaaaa aaaaa 2555

<210> 3

<211> 3664

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atggggcctg aaactgtctg ggtctgaget ggggagcggg agccacttgt ccctctccct 60
 ccccaggact tctgtgactc ctgggccaca gaggccaac cagggtaagg gcctggggat 120
 acccctgcc tggccccctt gcccaactg gcaggggggc caggctgggc agcagccct 180

ctttcacctc aactatggat ctctgcccc ccaagcccaa gtacaatcca ctccggaatg	240
agtctctgtc atcgtctggag gaaggggctt ctgggtccac ccccccggag gagctgcctt	300
ccccatcage ttcatccctg gggcccatcc tgccctctct gcctggggac gatagtccca	360
ctaccctgtg ctctctcttc ccccggatga gcaacctgag gctggccaac ccggtctgggg	420
ggcgcccagg gtctaagggg gagccaggaa gggcagctga tgatggggag gggatcgatg	480
gggcagccat gccagagtca ggcacctac cctcctcca ggacatgaac aagctgagtg	540
gaggcggegg ggcagggact cgggtggaag ggggccagct tgggggcgag gagtggacce	600
gccacgggag ctttgtcaat aagcccacgc ggggctggct gcacccaac gacaaagtca	660
tgggaccggg ggtttctac ttggttcggt acatgggttg tgtggaggtc ctccagtcaa	720
tgcgtgccct ggacttcaac acccggactc aggtcaccag ggagccatc agtctggtgt	780
gtgaggtgt gcccgggtgt aagggggcga caaggaggag aaagccctgt agccgcccgc	840
tcagctctat cctggggagg agtaacctga aatttctgg aatgccaatc actctaccg	900
tctccaccag cagcctcaac ctcatggccg cagactgcaa acagatcacc gccaacacc	960
acatgcaatc tatctcattt gcacccggcg gggatccgga cacagccgag tatgtgcct	1020
atgttgccaa agacctgtg aatcagagag cctgccacat tctggagtgt cccgaagggc	1080
ttgccagga tgatcaccg accattggcc aggccttcca gttgcgctc aaacaatacc	1140
tcaggaacc acccaactg gtcacctc atgacaggat ggctggcttt gatggtcag	1200
catgggatga ggaggaggaa gagccacctg accatcagta ctataatgac ttcccgggga	1260
aggaaccccc cttggggggg gtggtagaca tgaggcttcg ggaaggagcc gctccagggg	1320
ctgctcgacc cactgcacc aatgccaga ccccagcca cttgggaget acattgcctg	1380
taggacagcc tgttggggga gatccagaag tccgcaaca gatgccacct ccaccacct	1440
gtccaggcag agagcttttt gatgatecct cctatgtcaa cgtccagaac ctagacaagg	1500
cccggcaage agtgggtggt gctgggcccc ccaatcctgc tatcaatggc agtgcacccc	1560
gggacctgtt tgacatgaag cccttcgaag atgctcttcg ggtgectcca cctccccagt	1620

cggtgtccat ggctgagcag ctccgagggg agccctggtt ccatgggaag ctgagccggc	1680
gggaggetga ggcactgctg cagetcaatg gggacttctt ggtacgggag agcacgacca	1740
cacctggcca gtatgtgctc actggcttgc agagtgggca gcctaagcat ttgctactgg	1800
tggacctga ggggtgtggtt cggactaagg atcaccgctt tgaaagtgtc agtcacctta	1860
tcagctacca catggacaat cacttgccca tcctctctgc gggcagcgaa ctgtgtctac	1920
agcaacctgt ggagcggaaa ctgtgatctg cctagecct ctcttcaga agatgcctc	1980
caatccttc caccctattc cctaactctc gggacctcgt ttgggagtgt tctgtgggct	2040
tggccttgtg tcagagctgg gagtagcatg gactctgggt ttcatatcca gctgagtgag	2100
agggtttgag tcaaaagcct gggtgagaat cctgcctctc cccaaacatt aatcaccaaa	2160
gtattaatgt acagagtggc cctcacctg ggcctttcct tgccaacct gatgccctt	2220
ccccaagaag gtgagtgctt gtcatggaaa atgtcctgtg gtgacaggcc cagtggaaaca	2280
gtcaccttc tgggcaaggg ggaacaaatc acacctctgg gcttcagggt atcccagacc	2340
cctctcaaca cccgcccc ccatgtttaa actttgtgcc ttgaccatc tcttaggtct	2400
aatgatatt tatgcaaaca gttcttggac ccctgaattc ttcaatgaca gggatgcca	2460
cacctcttg gcttctggga cctgtttct tgetgagcac cctctccgt ttgggttggg	2520
ataacagagg caggagtggc agctgteccc tctcctggg gatatgcaac ccttagagat	2580
tgccccagag cccactccc ggcagggcgg gagatggacc cctcccttgc tcagtgcctc	2640
ctggccgggg cccctcacc caaggggtct gtatatacat tcataagge ctgccctccc	2700
atgttgcatt cctatgtact ctgcgcaaaa gtgcagccct tctcctgaa gcctctgccc	2760
tgcctcctt tctgggaggg cggggtgggg gtgactgaat ttggcctct tgtacagtta	2820
actctcccag gtggattttg tggaggtgag aaaaggggca ttgagactat aaagcagtag	2880
acaatccca cataccatct gtagagttgg aactgeatc ttttaaagtt ttatatgeat	2940
atattttagg gctgctagac ttacttctct atttctttt ccattgetta ttcttgagca	3000
caaatgata atcaattatt acatttatac atcacctttt tgacttttcc aagccctttt	3060

acagctcttg gcattttcct cgcctaggcc tgtgaggtaa ctgggatcgc accttttata 3120
 ccagagacct gaggcagatg aaatttattt ccatctagga ctagaaaaac ttgggtctct 3180
 taccgcgaga ctgagaggca gaagtcagcc cgaatgcctg tcagtttcat ggaggggaaa 3240
 cgcaaaacct gcagttcctg agtaccttct acaggcccgg cccagcctag gcccggggtg 3300
 gccacaccac agcaagccgg cccccctct tttggccttg tggataaggg agagttgacc 3360
 gttttcatcc tggcctcctt ttgctgtttg gatgtttcca cgggtctcac ttataccaaa 3420
 ggaaaaactc ttcattaaag tccgtatttc ttctaaaaaa aaaaaaaaaa aaatacattt 3480
 atacatcacc tttttgaact ttccaagccc ttttacagct cttggcattt tectcgcta 3540
 ggctgtgag gtaactggga tcgcacctt tataccagag acctgagga gatgaaattt 3600
 atttccatct aggactagaa aaacttgggt ctctaccgc gagactgaga ggcagaagtc 3660
 agcc 3664

<210> 4
 <211> 915
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Met Ala Asp Glu Ala Leu Ala Gly Leu Asp Glu Gly Ala Leu Arg Lys
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Val Thr Ala Asp Leu Ala Glu Arg Arg Arg Ile Arg Ser
 20 25 30

Ala Ile Arg Glu Leu Gln Arg Gln Glu Leu Glu Arg Glu Glu Glu Ala
 35 40 45

Leu Ala Ser Lys Arg Phe Arg Ala Glu Arg Gln Asp Asn Lys Glu Asn
 50 55 60

Trp Leu His Ser Gln Gln Arg Glu Ala Glu Gln Arg Ala Ala Leu Ala
 65 70 75 80

Arg Leu Ala Gly Gln Leu Glu Ser Met Asn Asp Val Glu Glu Leu Thr
85 90 95

Ala Leu Leu Arg Ser Ala Gly Glu Tyr Glu Glu Arg Lys Leu Ile Arg
100 105 110

Ala Ala Ile Arg Arg Val Arg Ala Gln Glu Ile Glu Ala Ala Thr Leu
115 120 125

Ala Gly Arg Leu Tyr Ser Gly Arg Pro Asn Ser Gly Ser Arg Glu Asp
130 135 140

Ser Lys Gly Leu Ala Ala His Arg Leu Glu Gln Cys Glu Val Pro Glu
145 150 155 160

Arg Glu Glu Gln Glu Gln Gln Ala Glu Val Ser Lys Pro Thr Pro Thr
165 170 175

Pro Glu Gly Thr Ser Gln Asp Val Thr Thr Val Thr Leu Leu Leu Arg
180 185 190

Ala Pro Pro Gly Ser Thr Ser Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Ser Ser
195 200 205

Pro Thr Pro Ala Ser Pro Glu Pro Pro Leu Glu Pro Ala Glu Ala Gln
210 215 220

Cys Leu Thr Ala Glu Val Pro Gly Ser Pro Glu Pro Pro Pro Ser Pro
225 230 235 240

Pro Lys Thr Thr Ser Pro Glu Pro Gln Glu Ser Pro Thr Leu Pro Ser
245 250 255

Thr Glu Gly Gln Val Val Asn Lys Leu Leu Ser Gly Pro Lys Glu Thr
260 265 270

Pro Ala Ala Gln Ser Pro Thr Arg Gly Pro Ser Asp Thr Lys Arg Ala
 275 280 285

Asp Val Ala Gly Pro Arg Pro Cys Gln Arg Ser Leu Ser Val Leu Ser
 290 295 300

Pro Arg Gln Pro Ala Gln Asn Arg Glu Ser Thr Pro Leu Ala Ser Gly
 305 310 315 320

Pro Ser Ser Phe Gln Arg Ala Gly Ser Val Arg Asp Arg Val His Lys
 325 330 335

Phe Thr Ser Asp Ser Pro Met Ala Ala Arg Leu Gln Asp Gly Thr Pro
 340 345 350

Gln Ala Ala Leu Ser Pro Leu Thr Pro Ala Arg Leu Leu Gly Pro Ser
 355 360 365

Leu Thr Ser Thr Thr Pro Ala Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 370 375 380

Gly Pro Ser Asp Thr Ser Ser Arg Phe Ser Lys Glu Gln Arg Gly Val
 385 390 395 400

Ala Gln Pro Leu Ala Gln Leu Arg Ser Cys Pro Gln Glu Glu Gly Pro
 405 410 415

Arg Gly Arg Gly Leu Ala Ala Arg Pro Leu Glu Asn Arg Ala Gly Gly
 420 425 430

Pro Val Ala Arg Ser Glu Glu Pro Gly Ala Pro Leu Pro Val Ala Val
 435 440 445

Gly Thr Ala Glu Pro Gly Gly Ser Met Lys Thr Thr Phe Thr Ile Glu
 450 455 460

Ile Lys Asp Gly Arg Gly Gln Ala Ser Thr Gly Arg Val Leu Leu Pro
465 470 475 480

Thr Gly Asn Gln Arg Ala Glu Leu Thr Leu Gly Leu Arg Ala Pro Pro
485 490 495

Thr Leu Leu Ser Thr Ser Ser Gly Gly Lys Ser Thr Ile Thr Arg Val
500 505 510

Asn Ser Pro Gly Thr Leu Ala Arg Leu Gly Ser Val Thr His Val Thr
515 520 525

Ser Phe Ser His Ala Pro Pro Ser Ser Arg Gly Gly Cys Ser Ile Lys
530 535 540

Met Glu Pro Glu Pro Ala Glu Pro Leu Ala Ala Ala Val Glu Ala Ala
545 550 555 560

Asn Gly Ala Glu Gln Thr Arg Val Asn Lys Ala Pro Glu Gly Arg Ser
565 570 575

Pro Leu Ser Ala Glu Glu Leu Met Thr Ile Glu Asp Glu Gly Val Leu
580 585 590

Asp Lys Met Leu Asp Gln Ser Thr Asp Phe Glu Glu Arg Lys Leu Ile
595 600 605

Arg Ala Ala Leu Arg Glu Leu Arg Gln Arg Lys Arg Asp Gln Arg Asp
610 615 620

Lys Glu Arg Glu Arg Arg Leu Gln Glu Ala Arg Gly Arg Pro Gly Glu
625 630 635 640

Gly Arg Gly Asn Thr Ala Thr Glu Thr Thr Thr Arg His Ser Gln Arg
645 650 655

Ala Ala Asp Gly Ser Ala Val Ser Thr Val Thr Lys Thr Glu Arg Leu
660 665 670

Val His Ser Asn Asp Gly Thr Arg Thr Ala Arg Thr Thr Thr Val Glu
675 680 685

Ser Ser Phe Val Arg Arg Ser Glu Asn Gly Ser Gly Ser Thr Met Met
690 695 700

Gln Thr Lys Thr Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Lys Met Gly Ser
705 710 715 720

Ile Phe Asp Arg Glu Asp Gln Ala Ser Pro Arg Ala Gly Ser Leu Ala
725 730 735

Ala Leu Glu Lys Arg Gln Ala Glu Lys Lys Lys Glu Leu Met Lys Ala
740 745 750

Gln Ser Leu Pro Lys Thr Ser Ala Ser Gln Ala Arg Lys Ala Met Ile
755 760 765

Glu Lys Leu Glu Lys Glu Gly Ala Ala Gly Ser Pro Gly Gly Pro Arg
770 775 780

Ala Ala Val Gln Arg Ser Thr Ser Phe Gly Val Pro Asn Ala Asn Ser
785 790 795 800

Ile Lys Gln Met Leu Leu Asp Trp Cys Arg Ala Lys Thr Arg Gly Tyr
805 810 815

Glu His Val Asp Ile Gln Asn Phe Ser Ser Ser Trp Ser Asp Gly Met
820 825 830

Ala Phe Cys Ala Leu Val His Asn Phe Phe Pro Glu Ala Phe Asp Tyr
835 840 845

Gly Gln Leu Ser Pro Gln Asn Arg Arg Gln Asn Phe Glu Val Ala Phe
850 855 860

Ser Ser Ala Glu Thr His Ala Asp Cys Pro Gln Leu Leu Asp Thr Glu
865 870 875 880

Asp Met Val Arg Leu Arg Glu Pro Asp Trp Lys Cys Val Tyr Thr Tyr
885 890 895

Ile Gln Glu Phe Tyr Arg Cys Leu Val Gln Lys Gly Leu Val Lys Thr
900 905 910

Lys Lys Ser
915

<210> 5
<211> 433
<212> PRT
<213> 人

<400> 5

Met Cys Leu Arg Gly Gly Cys Ser Pro Arg Ala Pro Ala Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gln Pro Arg Pro Pro Pro Ala Leu Pro Pro Arg Pro Arg Ala Pro Val
20 25 30

Pro Ala Ser Arg Pro Gly Arg Pro Leu Leu Thr Pro Ala Arg Pro Cys
35 40 45

Gly Arg Met Arg Arg Gly Ser Pro Gly Pro Arg Leu Gly Gly Ser Arg
50 55 60

Gly Glu Arg Arg Arg Pro Ala Gly Arg Asp Pro Ala Arg Val Gly Pro
65 70 75 80

Gly Gln Gly Leu Arg Arg Pro Ala Arg Pro Gly Pro Ala Ala Trp Thr
 85 90 95

Glu Thr Gly Gln Gly Ile Val His Ala Leu Thr Asp Leu Ser Ile Pro
 100 105 110

Gly Met Thr Ser Gly Asn Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ile Ala Gly Thr
 115 120 125

Ala Pro Gln Asn Gly Glu Asn Lys Pro Pro Gln Ala Ile Val Lys Pro
 130 135 140

Gln Ile Leu Thr His Val Ile Glu Gly Phe Val Ile Gln Glu Gly Ala
 145 150 155 160

Asp Val Ser Arg Trp Asp Ala Arg Leu Leu Val Gly Asn Leu Lys Lys
 165 170 175

Lys Tyr Ala Gln Gly Phe Leu Pro Glu Lys Leu Pro Gln Gln Asp His
 180 185 190

Thr Thr Thr Thr Asp Ser Glu Met Glu Glu Pro Tyr Leu Gln Glu Ser
 195 200 205

Lys Glu Glu Gly Ala Pro Leu Lys Leu Lys Cys Glu Leu Cys Gly Arg
 210 215 220

Val Asp Phe Ala Tyr Lys Phe Lys Arg Ser Lys Arg Phe Cys Ser Met
 225 230 235 240

Ala Cys Ala Lys Arg Tyr Asn Val Gly Cys Thr Lys Arg Val Gly Leu
 245 250 255

Phe His Ser Asp Arg Ser Lys Leu Gln Lys Ala Gly Ala Ala Thr His
 260 265 270

Asn Arg Arg Arg Pro Ala Lys Pro Val Cys His His Leu Pro Arg Ile
 275 280 285

Pro Arg Ser Ser Gln Gln Ala Leu Cys Pro Phe Arg Leu Leu Leu Leu
 290 295 300

Cys Val Thr His Ser Gln Glu Asp Ser Ser Arg Cys Ser Asp Asn Ser
 305 310 315 320

Ser Tyr Glu Glu Pro Leu Ser Pro Ile Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ser
 325 330 335

Ala Gly Asp Lys Ala Ser Gly Thr Trp Ser Ser Pro Thr Cys Ile Cys
 340 345 350

Gly Thr Trp Trp Ala Trp Asp Thr Thr Ser Cys Gln Val Ser His Gln
 355 360 365

Val Asn Val Glu Asp Val Tyr Glu Phe Ile Arg Ser Leu Pro Gly Cys
 370 375 380

Gln Glu Ile Ala Glu Glu Phe Arg Ala Gln Glu Ile Asp Gly Gln Ala
 385 390 395 400

Leu Leu Leu Leu Lys Glu Asp His Leu Met Ser Val Met Asn Ile Lys
 405 410 415

Leu Gly Pro Ala Leu Lys Ile Tyr Ala Arg Ile Ser Met Leu Lys Asp
 420 425 430

Ser

<210> 6

<211> 578

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Met Asp Leu Leu Pro Pro Lys Pro Lys Tyr Asn Pro Leu Arg Asn Glu
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ser Leu Glu Glu Gly Ala Ser Gly Ser Thr Pro Pro Glu
20 25 30

Glu Leu Pro Ser Pro Ser Ala Ser Ser Leu Gly Pro Ile Leu Pro Pro
35 40 45

Leu Pro Gly Asp Asp Ser Pro Leu Pro Cys Val Pro Ser Phe Pro Arg
50 55 60

Met Ser Asn Leu Lys Leu Ala Asn Pro Ala Gly Gly Pro Trp Gly Leu
65 70 75 80

Lys Gly Ser Gln Glu Arg Leu Leu Lys Met Gly Lys Gly Val Gln Gly
85 90 95

Gln Pro Phe Gly Leu Arg Pro Leu Ala Pro Pro Pro Asp Met Asn Lys
100 105 110

Leu Ser Gly Gly Gly Gly Arg Arg Thr Arg Val Glu Gly Gly Gln Leu
115 120 125

Gly Gly Glu Glu Trp Thr Arg His Gly Ser Phe Val Asn Lys Pro Thr
130 135 140

Arg Gly Trp Leu His Pro Asn Asp Lys Val Met Gly Pro Gly Val Ser
145 150 155 160

Tyr Leu Val Arg Tyr Met Gly Cys Val Glu Val Leu Gln Ser Met Arg
165 170 175

Ala Leu Asp Phe Asn Thr Arg Thr Gln Val Thr Arg Glu Ala Ile Ser
 180 185 190

Leu Val Cys Glu Ala Val Pro Gly Ala Lys Gly Ala Thr Arg Arg Arg
 195 200 205

Lys Pro Cys Ser Arg Pro Leu Ser Ser Ile Leu Gly Arg Ser Asn Leu
 210 215 220

Lys Phe Ala Gly Met Pro Ile Thr Leu Thr Val Ser Thr Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Asn Leu Met Ala Ala Asp Cys Lys Gln Ile Ile Ala Asn His His Met
 245 250 255

Gln Ser Ile Ser Phe Ala Ser Gly Gly Asp Pro Asp Thr Ala Glu Tyr
 260 265 270

Val Ala Tyr Val Ala Lys Asp Pro Val Asn Gln Arg Ala Cys His Ile
 275 280 285

Leu Glu Cys Pro Glu Gly Leu Ala Gln Asp Val Ile Ser Thr Ile Gly
 290 295 300

Gln Ala Phe Glu Leu Arg Phe Lys Gln Tyr Leu Arg Asn Pro Pro Lys
 305 310 315 320

Leu Val Thr Pro His Asp Arg Met Ala Gly Phe Asp Gly Ser Ala Trp
 325 330 335

Asp Glu Glu Glu Glu Glu Pro Pro Asp His Gln Tyr Tyr Asn Asp Phe
 340 345 350

Pro Gly Lys Glu Pro Pro Leu Gly Gly Val Val Asp Met Arg Leu Arg
 355 360 365

Glu Gly Ala Ala Arg Pro Thr Leu Pro Ser Ala Gln Met Ser Ser His
 370 375 380

Leu Gly Ala Thr Leu Pro Ile Gly Gln His Ala Ala Gly Asp His Glu
 385 390 395 400

Val Arg Lys Gln Met Leu Pro Pro Pro Pro Cys Pro Gly Arg Glu Leu
 405 410 415

Phe Asp Asp Pro Ser Tyr Val Asn Ile Gln Asn Leu Asp Lys Ala Arg
 420 425 430

Gln Ala Gly Gly Gly Ala Gly Pro Pro Asn Pro Ser Leu Asn Gly Ser
 435 440 445

Ala Pro Arg Asp Leu Phe Asp Met Lys Pro Phe Glu Asp Ala Leu Arg
 450 455 460

Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser Met Ser Met Ala Glu Gln Leu Gln Gly
 465 470 475 480

Glu Pro Trp Phe His Gly Lys Leu Ser Arg Arg Glu Ala Glu Ala Leu
 485 490 495

Leu Gln Leu Asn Gly Asp Phe Leu Val Arg Glu Ser Thr Thr Thr Pro
 500 505 510

Gly Gln Tyr Val Leu Thr Gly Leu Gln Ser Gly Gln Pro Lys His Leu
 515 520 525

Leu Leu Val Asp Pro Glu Gly Val Val Arg Thr Lys Asp His Arg Phe
 530 535 540

Glu Ser Val Ser His Leu Ile Ser Tyr His Met Asp Asn His Leu Pro
 545 550 555 560

Ile Ile Ser Ala Gly Ser Glu Leu Cys Leu Gln Gln Pro Val Asp Arg
565 570 575

Lys Val

cccacgcgtccgggggacgggtgctgagcgggacctgggacagcgggtcgcggcacctcccgcctgctgctgtaac
cgctgtcgggtcccgaagagctaagccgagcctgcgccggacgggtgggctggactgagagaattctctgagctgg
tgacaggtgccacaggcactggggatctcaccagaaaggaaccgacggagctaggggcccagcgagatggcggac
gaggccttagctgggctggatgagggagcccttcggaagctgctggaggcacagcagatctggcagagcggcggcg
catccgctcagccatccgggaactgcagcggcaggagctggagcggcaggaggaggccctggcatccaagcgttcc
cgtgccgagcggcaggacaacaaggagaactggctgcactctcagcagcgggaagctgagcagcgggtgccctg
gcacggctggcagggcagctggagtcctgaacgatgtggaggaattgactgcactgttgcgaagcgcctggtgagat
gaggagcgaagctgatccgagctccatccgcctgtacgggctcaggagattgaggctgccacctggctgggag
ggtgtacagcgggctcccaacagtggctcaagagagggacagcaaggggctagcggcacacaggtggaacagtgt
gaggtgccagagcagaggaacaggaacagcaggcagaggttcaagccaacccccaccctgaaggcaccag
ccaggtgtgaccacagtgcactcctgctgcgagccccacctgggagccatccagctcacctgcctcaccagcag
ttcaccacccctgctctcctgagcctccattggagcctgccgagggcccagtgcttacagctgaggttccaggcagcc
cagagccacccccagcccaccaagaccaccagccctgagcctcaggagctccaacgctccccagcactgaggg
ccaggtgtcaacaagcttctgtctggccccaaagagacctgctgccagagccccaccagaggccccctgtgacac
caagagagcagacgtggctggacccccgacctccaacgctccctgctcgggtgctcagccccgccaaccagccccag
aaccgagagtccacccccctgccagcggaccttctcattccagcgggctggctctgtgctgggatcgtgtccacaagtt
cacatctgattctctatggctgctaggctccaggtggcacacccccaggctgccctaagtcctcctgacccccgcaaggc
tctgggccccctccctcaccagcaccacccctgctctcctccagcggctcctcctcctggggccccagtgatacctct
cccggctcagcaaggagcaacgaggagtagcccagccccggcccagcttgaagctgccccagggaggaggcc
ccagggggcggggtggctgctaggccccgtgaaaacagagcaggggggctgtggcacgttcagaggagcctggt
gccccgctgccgtggcctgccaactgccgagccagggggcagtatgaagaccacattcacatcgagatcaagg
acggcctggccaggcctccacagccgggtgctgctgccacaggcaaccagagggcagaactgacactggggc
tgccggcggccccgacctactcagcaccagtagtgggggcaagagcaccatcacccgtgcaacagcctgggac
cctggctcggctggcaggtgctactcatgtcaccagctcagccatgcccccccagtagccgaggaggctgcagcatc
aagatggaaccagagccagcagagcctctcgtgcagcagtggaagcggccaatggggctgagcagaccaggtg
aacaagcaccagaagggcggagccctctgagcgtgaggagctgatgactattgaggatgaaggagtcttgaca
agatgctggatcagagcacggacttgaagagcgggaagctcatccgggctgcactcgtgagctccgacaaggaag
agagaccagcgggacaaggagcgggaacggcggctgcaggaggcacggggccggccaggggagggggcggcgg

图 1A

caacacagccactgagaccaccacgaggcacagccagoggcagctgatggctctgctgtagcactgttaccaag
actgagcggctcgtccactccaatgatggcacacggacggcccgaccaccacagtgaggctcagttcgtgaggcg
ctcggagaatggcagtgagcaccatgatgcaaaccaagacctctcctctcctccatccaagaagatgggcagc
atctcagaccgagaggaccaggccagcccacggccggcagcctggcggcgctcgagaaacggcaggccgagaa
gaagaaagagctgatgaaggcgagagctgcccgaagacctcagcctccaggcgcgcaaggccatgattgagaa
gctggagaaggaggggcgccggcagccctggcggaccccgcgagccgtgcagcgatccaccagctcggggg
ccccaacgccaacagcatcaagcagatgctgctggactggtgctgagccaagactcgggctacgagcacgtcgac
atccagaactctcctccagctggagtgatgggatggcctctgtgccctggtgcacaactctcctgaggcctcgaact
gggcagcttagccctcagaaccgacgccagaactcagagtgccctctcatctcgggagacctatgaggactgccc
cagctcctggatacagaggacatggtgaggctcagagcctgactggaagtgcgtgtacacgtacatccaggaattc
accgctgtctggtccagaaggggctggtaaaaacaaaaagctctaaccctgctcggggccccacggatgctggtg
actgtgtccccigtgaggtggacgacatgatgatcatgggcaagaagcctgacccaagtgtgtctcacctatg
cagtcgctacaaccacctcgcagccacgaactgcgcctgcggcaagaatgtctagcctgcccggccgcatggc
cagccagtggaagtgcgccccactctcgggacccgtctcctgctgtgctcggcccaaccgctgccctgtctgtg
cgacacctccccccacatacacagcagcgtttgataaattatggtttcaacgaaaaaaaaaaaaaaaa

图 1B

ggcgcccgatgtgtctccgcgggcggtgcagccctcgagcgcccgcgcccgaacccccggccgcccgc
 cctccccccccggcctcgcccccgctcccgccctcgccccggccccccttggtagcggccaggccggtcggt
 cggatgcgcccggcagccccggccccggctcggaggctcccgggcgagaggaggcggcccggccggcggg
 acccgcgagtcggccccggccaggggctcgttaggccccggccaggcccagccgctggacagagaca
 gggcagggcattgtcatgactgaccgacctcagcatccccggcatgacctcagggaaacggaactctgctccagc
 atgcccgcactgccccccagaatggtgagaataaaccaccacaggccattgtgaaaccccaaatctgacgcatgtt
 atcgaaggggttgatccaggagggggcggaacgttccgggtgggacgctcgtctgctggtggggaatctcaagaaga
 agtatgcacaggggttctgctgagaaaactccacagcaggatcacaccaccaccactgactcggagatggaggag
 ccctatctcaagaatccaagaggaggggtctccctcaaactcaagtgtgagctctgtggccgggtggactttgcctat
 aagttcaagcgtccaagcgtctgttccatggctgtgcaaagaggtacaacgtgggatgcaccaaaccgggtgggact
 ttccactcagaccggagcaagctgcagaaggcaggagctcgcaccacaaccgcccgcggccagcaaagccagtc
 tgccaccacttaccaggataccaagaagcagccaacaggcactgtgccccttcggttactgctgcttggcgtaacaca
 cagccaggaagactccagccgtgtcagataactcaagctatgaggaacccttgtcaccatctcagccagctcatcta
 ctcccgccggcgacaaggccagcgggacctggagctccccgacatgcatatgcccggacctggggcatgggacacc
 acttctgccaagtgcaccaccaagtgaatgtagaagacgtctacgaattcatccgctctctgcccagggtccaggagat
 agcagaggaatccgtgcccaggaaatcgacgggcaagccctgctgctgctcaaggaggaccacctgatgagcgttat
 gaacatcaagctggggccccgcccgaagatctaccccgcacatgctcaaggactcctagggtgggtggcaccac
 ggattctgcccagggcgctcctccccgactgagcagagccagacagacattcctgaggggcccagaaaaggcggc
 gttggagggcaggggctctccctaggggcatagctggtgaggaggctgggacacctctccatggctctcaggggcttt
 ctttctgtgggaggggagagaggtagggtggcacagaagatggggctttatgctgtgaaatattgatagcactggcttct
 ccaaagtcccaatactctagccccgctctctccctcttctgtccccattttccaggggtatattgggtcagggctcccaa
 cctgagttggttactcaaggcagccagcaggcctggatggaggcctagaaagcccttgccctctctctcccacttcttc
 tccaggcctggttaactctccggtgtcagctctcccccttcagcctgttctgagcagccaggggttccccctacacct
 ctgcaggtggagagagagaagctgggcccagccggtgctgctgccaagacgccttaacgctgtgtgatgactg
 tgtgactgtgtgggagcctggactgacagataggccaagggctactctctggcatctccaggtgtttgtagcaaacagcc
 acttagtctttgctgactccactcagcctcaggatggggaatagccaagaatggcagcctcagcgcagaggcaag
 gtcagaaagagacggcgcttcagagttccttccagacaccctccccgactgtgaagttcccctgaccg

图 2A

ccctcctggttcacaaagagcattaagaaagctgcggtggtctgagcaacatagcccagacgtggagcctcctggcctg
cctgcccgccaccctgggagtcagtggtgaggctcagagaacttctaaggggaaagaacagctggagtttctgtga
tgtgaagaaggcagctctggcctcccactcccacactcttgcctataaatcttctagcagcaatttgagctacctgagg
aggaggcagggcagaagggcaagggcctgcctctgacctgccgtgtccttgcaggaaggaggtaggcaccttctga
gcttattctattccccaccacacccccaggcaggggtgaaatgaaggactttttaaccttgtttgttttaaaaataaat
ctgtaaaatctgaaaaaaaaaaaaa

图 2B

atggggcctgaaactgtctgggtctgagctggggagcgggaagccactgtccctctccctccccaggacttctgtgactcct
gggccacagaggtccaaccagggttaagggcctggggatacccctgcctggcccccttgccaaaactggcaggggg
gccaggctgggcagcagcccctcttcacctcaactatggatctctgcccccaagccaagtacaatccactccgga
atgagctctgtcatcgtggaggaaggggcttctgggtccaccccccgaggagctgcctccccatcagcttcatccc
tggggcccatcctgcctcctctgctggggacgatagcccactaccctgtgctccttctccccggatgagcaacctgag
gctggccaacccggctggggggcgcccagggtctaagggggagccaggaagggcagctgatgaggggagggga
tcgatggggcagccaigccagagtcaggccccctaccctcctccaggacatgaacaagctgagtgaggggcggg
gocgaggactcgggtggaagggggccagcttggggcgaggagtgaccgccacgggagcttgcataaagccc
acgccccctggctgcatcccaacgacaaagtcagggaccggggttctacttggttcggtacatgggtgtgtgga
ggtctccagtcattcgtgccctggactcaacacccggactcaggtcaccaggaggccatcagctctggtgtgtgag
gctgtgccgggtgctaagggggcgacaaggaggagaaagccctgtagccgcccgtcagctctatcctggggagga
gtaacctgaaatttctggaatgccaatcactctcaccgtctccaccagcagcctcaacctcatggccgagactgcaa
cagatcatcgccaaccacccatgcaatctatctcatttgcattccggcggggatccggacacagccgagtatgtgccta
tgttgccaaagaccctgtgaatcagagagcctgccacattctggagtgcccgaagggcttgcccaggatgtcatcagca
ccattggccaggccttcgagttgctgctcaacaatacctcaggaaccacccaaactggcaccctcatgacaggat
ggctggcttctgatggctcagcatgggatgaggaggaggaagagccacctgaccatcagtaataatgacttccccggg
aaggaaccccccttgggggggtggtagacatgaggcttcgggaaggagccgctccaggggctgctcgaccactgc
acccaatgccagacccccagccacttgggagctacattgcctgtaggacagcctgttgggggagatccagaagtccg
caaacagatgccacctccaccacctgtccaggcagagagcttttgatgatccctcctatgtcaacgtccagaacctag
acaaggccccggaagcagtggtggtgctggccccccaatcctgctatcaatggcagtgcaccccgggacctgttg
acatgaagccctcgaagatgctcttgggtgctccacctccccagtcggtgtccatggctgagcagctccgaggggag
ccctggttccatgggaagctgagccggcgggaggctgaggcactgctgcagctcaatgggacttcttggtacgggag
agcacgaccacacctggccagtatgtctcactggctgcagagtgggcagcctaagcatttctactggtgaccctga
gggtgtggttcggactaaggatcaccgcttgaaagtgtcagtcaccttatcagctaccacatggacaatcactgcccac
atctctcgggcagcgaactgtgtctacagcaacctgtggagcggaaactgtgatctgccctagcgtctcttccagaag
atgccctccaatcctttccaccctatccctaactctcgggacctgttgggagtggtctgtgggcttgccctgtgtcagagct
gggagtagcatggactctgggttccatccagctgagtgagaggggttgagtcaaaagcctgggtgagaatcctgcctct
cccaaacattaatcaccaaagtattaatgtacagagtggccccctcacctgggcttctctgtccaacctgatgccctt

图 3A

ccccagaaggtagtgctgtcatggaaaatgcctgtggtgacaggcccagtggaacagtcaccctctgggcaagg
gggaacaaatcacacctctgggctcagggatcccagaccctctcaacacccgccccccatgtttaaactttgtgcc
ttgaccatctctaggtctaataatgatatttatgcaaacagttcttgaccctgaattctcaatgacagggatgccaacacct
tcttgctctgggacctgtgtctgtgagcaccctctccggttgggtgggataacagaggcaggagtgccagctgtcc
cctctccctggggatatgcaacccttagagattgccccagagccccactcccggccaggcgggagatggaccctccct
tgctcagtgctcctggccggggccctcaccacaaggggtctgtatatacattcataaggcctgccctcccattgtgcat
gcctatgtactctgcgccaagtgcagccctctcctgaagcctctgcctgcctcccttctgggagggcggggggg
gtgactgaatttggcctctgtacagtaactctccagggtgattttgtggaggtagaaaaggggcattgagactataa
agcagtagacaatccccacataccatctgtagagttggaactgcattctttaaagtttatatgcatatatttagggctgcta
gactacttctctatttcttccattgcttattctgagcacaataatgataatcaattattacattatacatcaccttttgactttc
caagccctttacagctcttggcatttctcctgcctaggcctgtgaggttaactgggatcgcacctttataccagagacctga
ggcagatgaaatttccatctaggactagaaaaactgggtctcttaccgagactgagaggcagaagtcagcccc
aatgcctgtcagttcatggaggggaaacgcaaacctgcagttcctgagtagcctctacaggccccggcccagcctagg
ccccgggtggccacaccacagcaagccggccccccctcttggcctgtggataaggagagttgaccgtttcatcctg
gcctcctttgtctgttggatgttccacgggtctcactataccaaagggaaaactcttcattaaagtcctgatttctcfaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaatacattatacatcaccttttgactttccaagccctttacagctcttggcatttctcgcctaggg
ctgtgaggttaactgggatcgcacctttataccagagacctgaggcagatgaaatttattccatctaggactagaaaaac
ttgggtctcttaccgagactgagaggcagaagtcagcc

图 3B

MADEALAGLDEGALRKLEVTADLAERRRIRSAIRELQRQELEREEEEALASKRFRAER
QDNKENWLHSQQREAEQRAALARLAGQLESMNDVEELTALLRSAGEYEERKLIRAAI
RRVRAQEIEAATLAGRLYSGRPNSGSRREDSKGLAAHRLEQCEVPEREEQEQQAEVS
KPTPTPEGTSQDVTTVLLLLRAPPGSTSSSPASPSSSPTPASPEPPLEPAEAQCLTAE
VPGSPEPPPSPPKTTSPPEQESPTLPSTEGQVVNKLKLSGPKETPAAQSPTTRGPSDTK
RADVAGPRPCQRSLSVLSPRQPAQNRESTPLASGPSSFQRAGSVRDRVHKFTSDSP
MAARLQDGTTPQAALSPLTPARLLGPSLTSTTPASSSSGSSSRGPSDTSSRFSKEQRG
VAQPLAQLRSCPQEEGPRGRGLAARPLENRAGGPVARSEEPGAPLPVAVGTAEPGG
SMKTTFTIEIKDGRGQASTGRVLLPTGNQRAELTLGLRAPPTLLSTSSGGKSTITRVNS
PGTLARLGSVTHVTSFSHAPPSSRGGCSIKMEPEPAEPLAAAVEAANGAEQTRVNKA
PEGRSPLSAEELMTIEDEGVLDKMLDQSTDFEERKLIRAAALRELQRKRDRDKERE
RRLQEARGRPGEGRGNTATETTTTRHSQRAADGSAVSTVTKTERLVHSNDGTRTART
TTVESSFVRRSENGSGSTMMQTKTFSSSSSSKMGSIQFDREDQASPRAGSLAALEKR
QAEKKKELMKAQSLPKTSASQARKAMIEKLEKEGAAGSPGGPRAAVQRSTSFGVNP
ANSIQMLLDWCRAKTRGYEHVDIQNFSSSWSDGMAFCALVHNFFPEAFDYGQLSP
QNRRQNFEVAFSSAETHADCPQLLDTEDMVRLREPDWKCVYTYIQEFYRCLVQKGL
VKTKKS

图 4

MCLRGGCSPRAPAAAPQPRPPPALPPRPRAPVPASRPGRPLLTPARPCGRMRRGS
PGPRLGGSRGERRRPAGRDPARVGPQGQLRRPARPGPAAWTETGQGIVHALTDLSI
PGMTSGNGNSASSIAGTAPQNGENKPPQAIVKPQILTHVIEGFVIQEGADVSRWDARL
LVGNLKKKYAQQGFLPEKLPQQDHTTTTDDSEMEEPYLQESKEEGAPLKLKCELCGRVD
FAYKFKRSKRFCSMACAKRYNVGCTKRVGLFHSDRSKLQKAGAATHNRRRPAKPVC
HHLPRIPRSSQQALCPFRLLLLCVTHSQEDSSRCSDNSSYEEPLSPISASSSTSAGDK
ASGTWSSPTCICGTWWAWDTTSCQVSHQVNVEDVYEFIRSLPGCQEIAEEFRAQEID
GQALLLLKEDHLMSVMNIKLGPAKLIYARISMLKDS

图 5

MDLLPPKPKYNPLRNESLSSLEEGASGSTPPEELPSPSASSLGPILPPLPGDDSP LPC
VPSFPRMSNLKLANPAGGPWGLKGSQERLLKMGKGVQGQPFGLRPLAPPPDMNKL
SGGGRRRTRVEGGQLGGEEWTRHGSFVNKPTRGWLHPNDKVMGPGVSYLVRYMG
CVEVLQSMRALDFNTRTQVTREAISLVCEAVPGAKGATR RRKPCSRPLSSILGRSNLK
FAGMPITLTVSTSSLNLMAADCKQIIANHHMQSISFASGGDPDTAEYVAYVAKDPVNQ
RACHILECPEGLAQDVISTIGQAFELRFKQYLRNPPKLVTPHDRAMAGFDGSAWDEEE
EPPDHQYYNDFPGKEPPLGGVDMRLREGAARPTLPSAQMSSHLGATLPIGQHAA
GDHEVRKQMLPPPPCPGRELFDDPSYVNIQNLDKARQAGGGAGPPNPSLNGSAPRD
LDMKPFEDALRVPPPPQSMSMAEQLQGEPWFHGKLSRREAEALLQLNGDFLVRES
TTTPGQYVLTGLQSGQPKHLLLVDPEGVVRTKDHRFESVSHLISYHMDNHLPIISAGS
ELCLQQPVDRKV

图 6

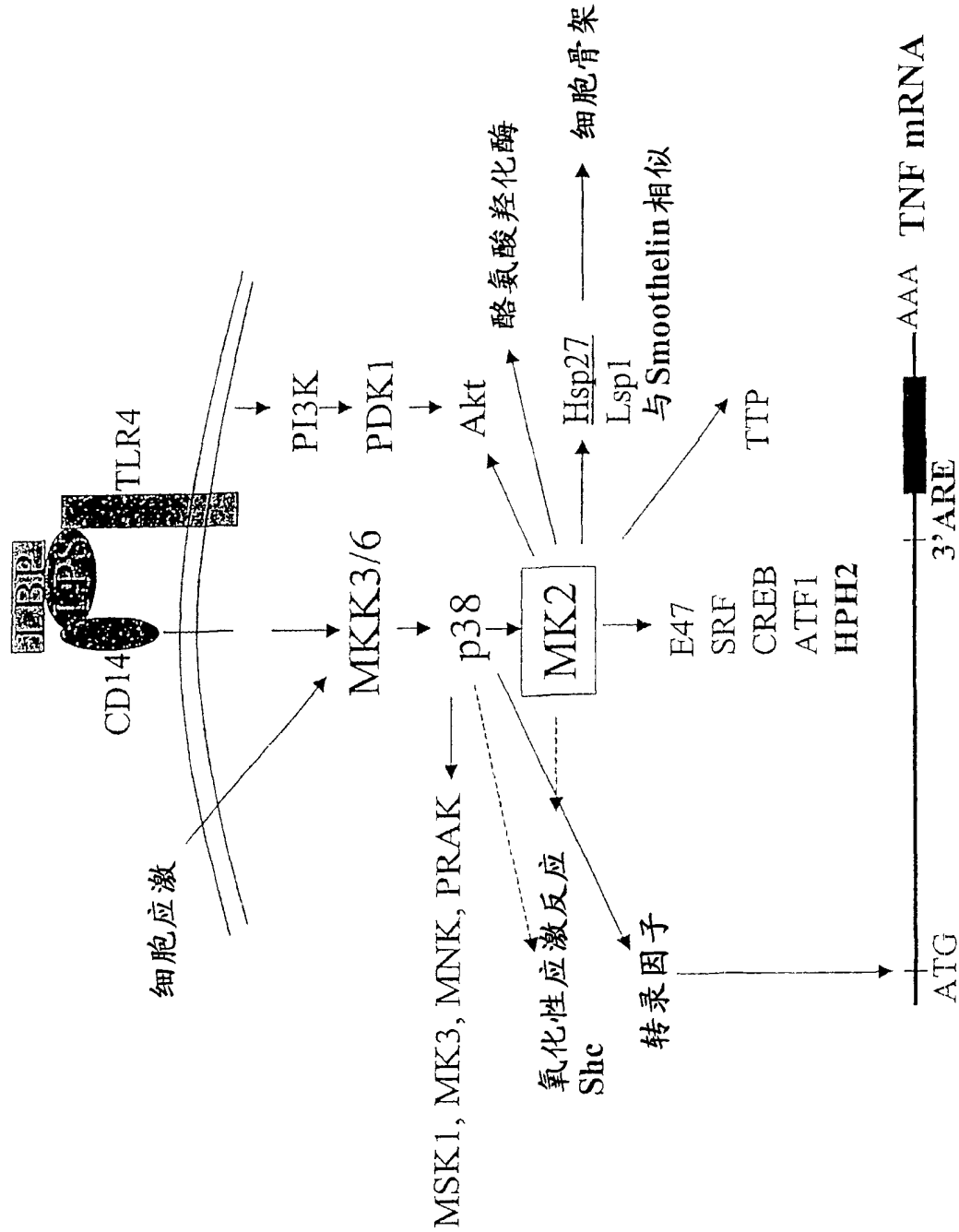


图 7

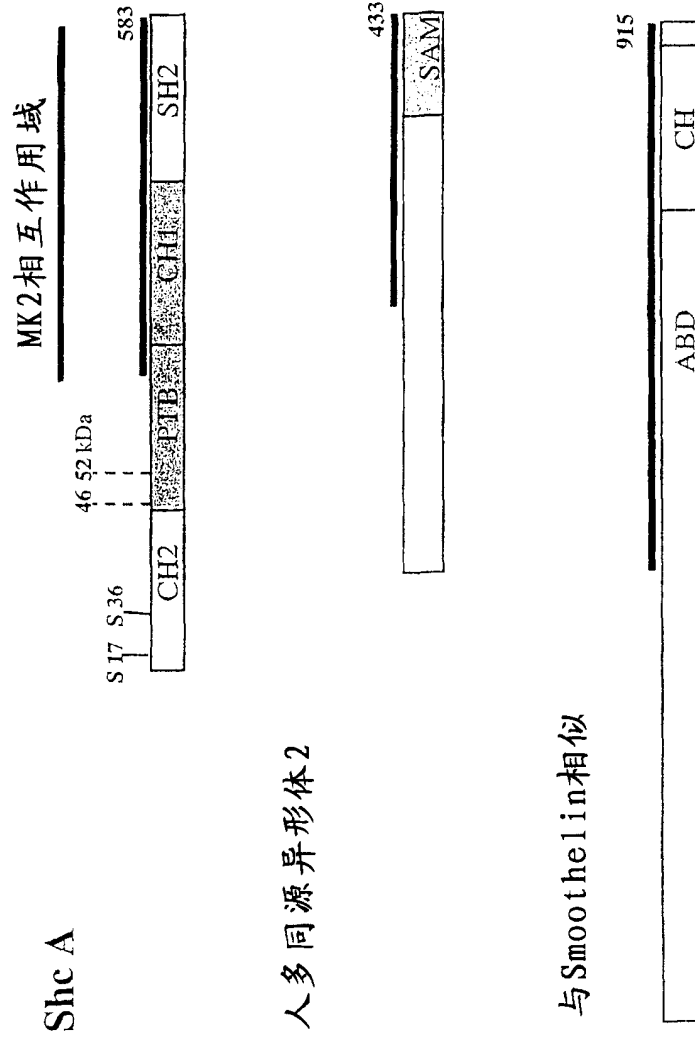


图 8

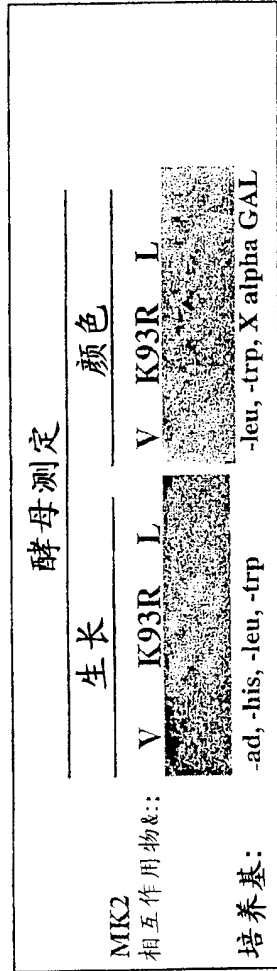


图 9A

生长与颜色

蛋白	V	K93R	MK2	TPL2 核纤层 蛋白
Shc A	-	+	+	-
人同源异形体2	-	+	+	-
与Smoothenlin相似	-	+	+	-

图 9B

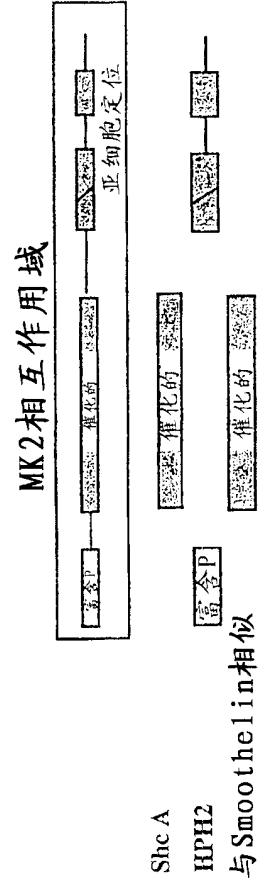


图 9C

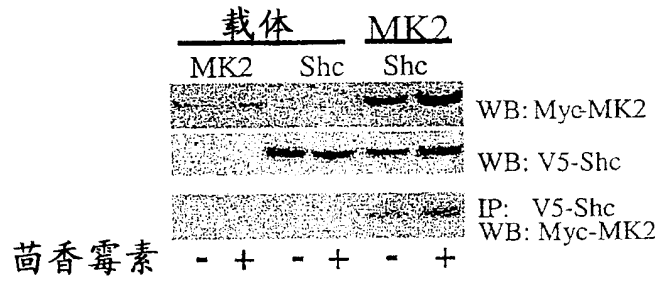


图 10A

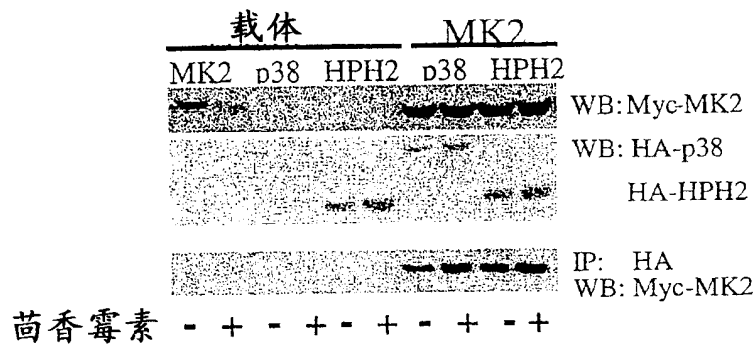


图 10B

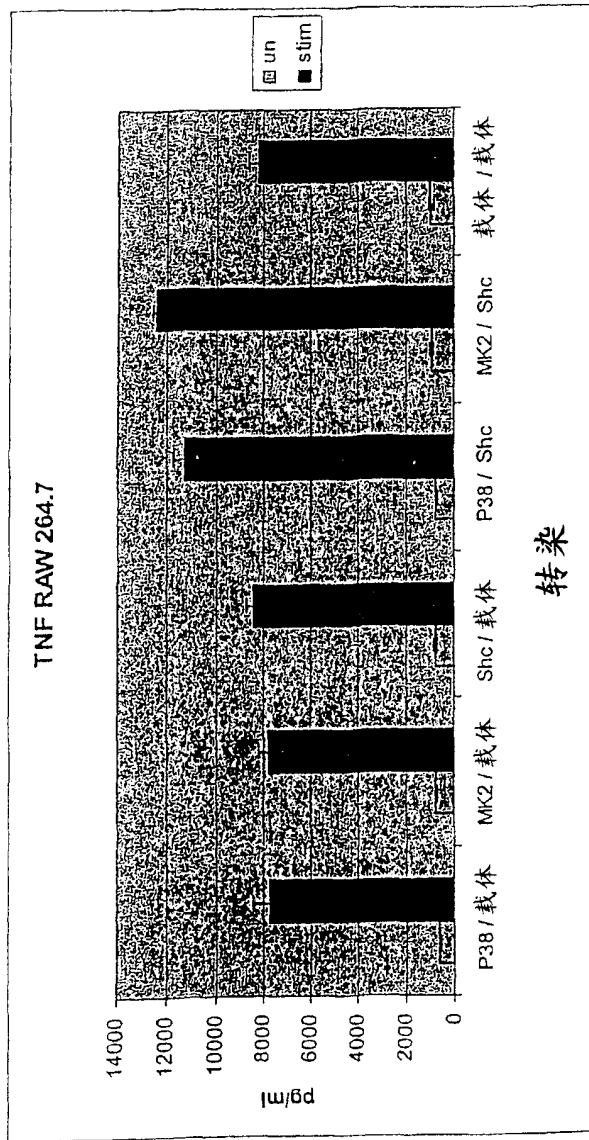


图 11

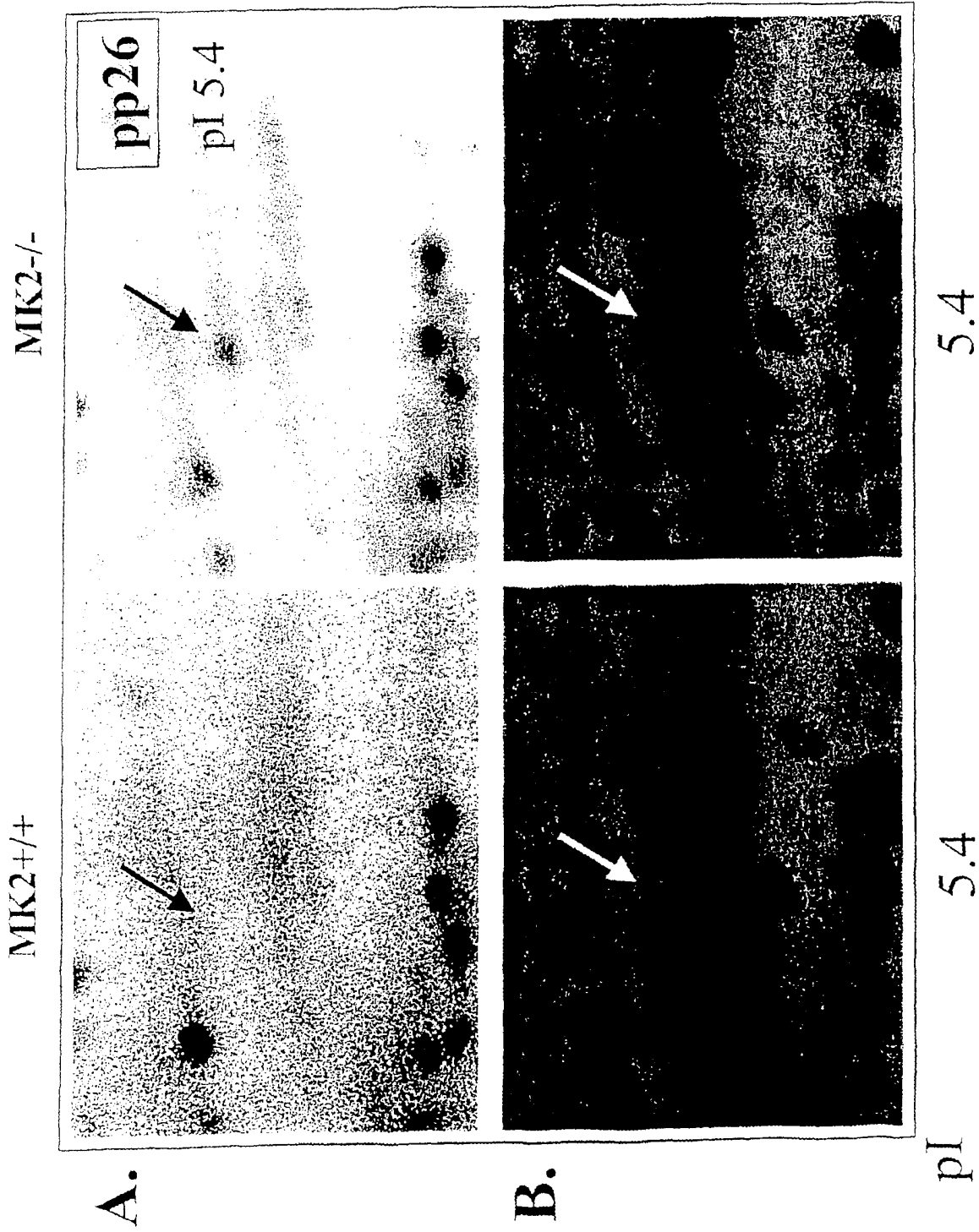


图 12

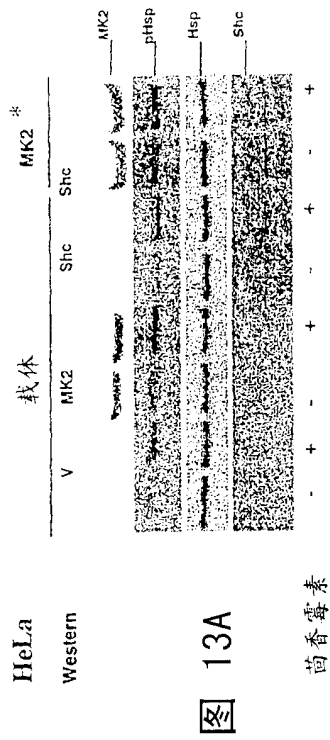


图 13A

茴香毒素

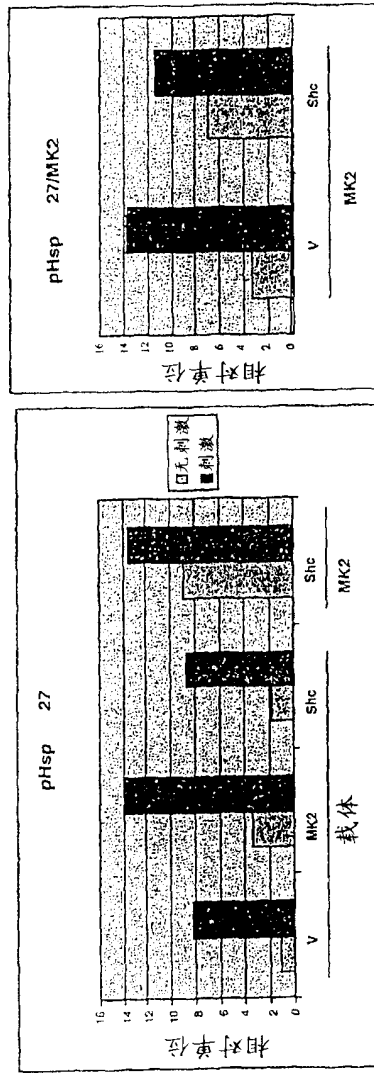


图 13B

图 13C

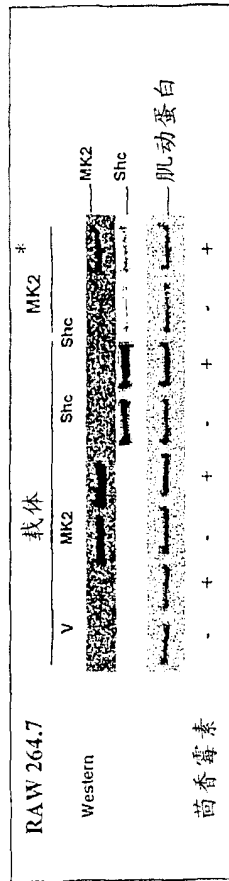


图 14A

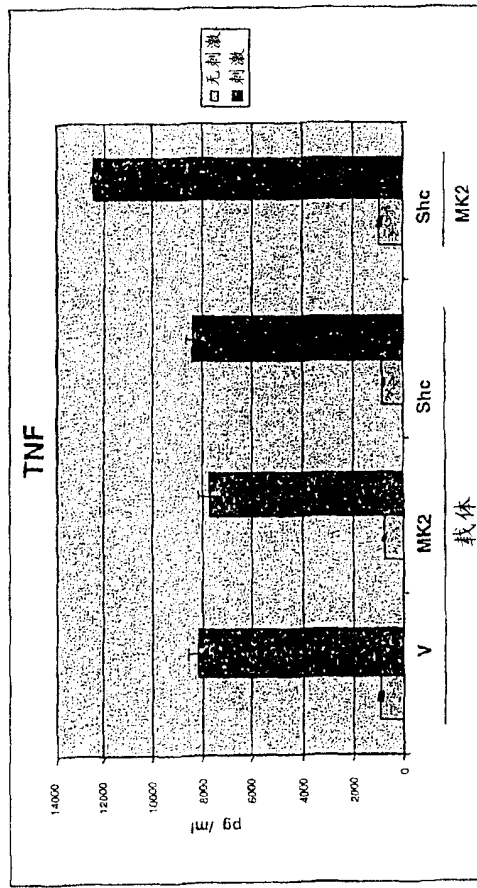


图 14B

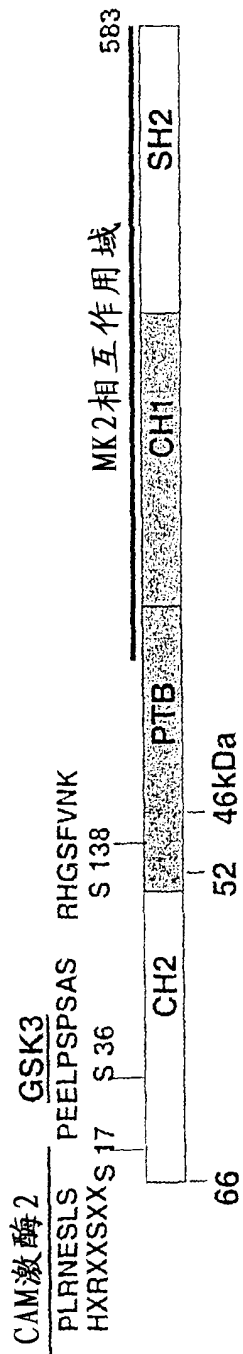


图 15A

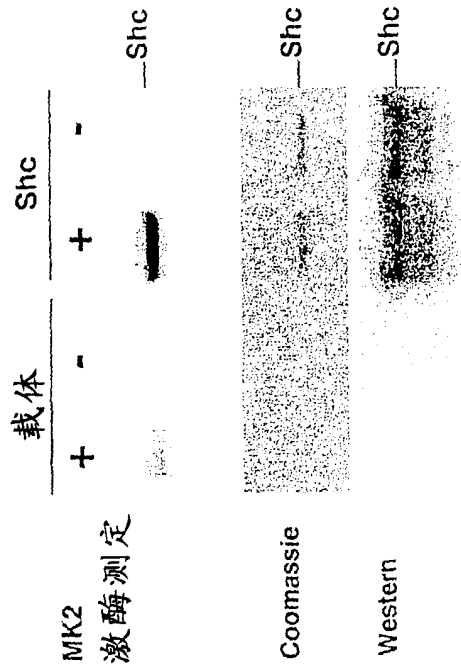


图 15B

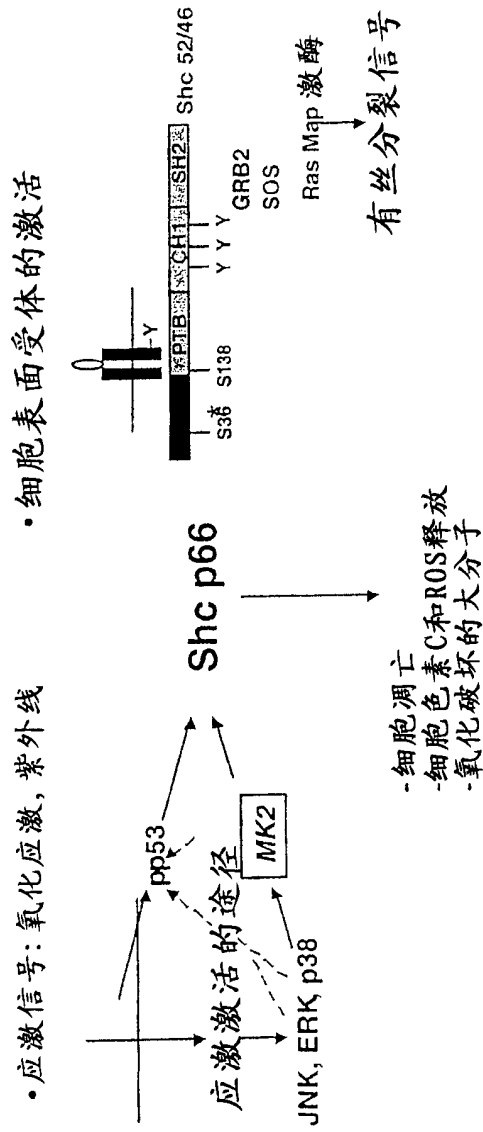


图 16

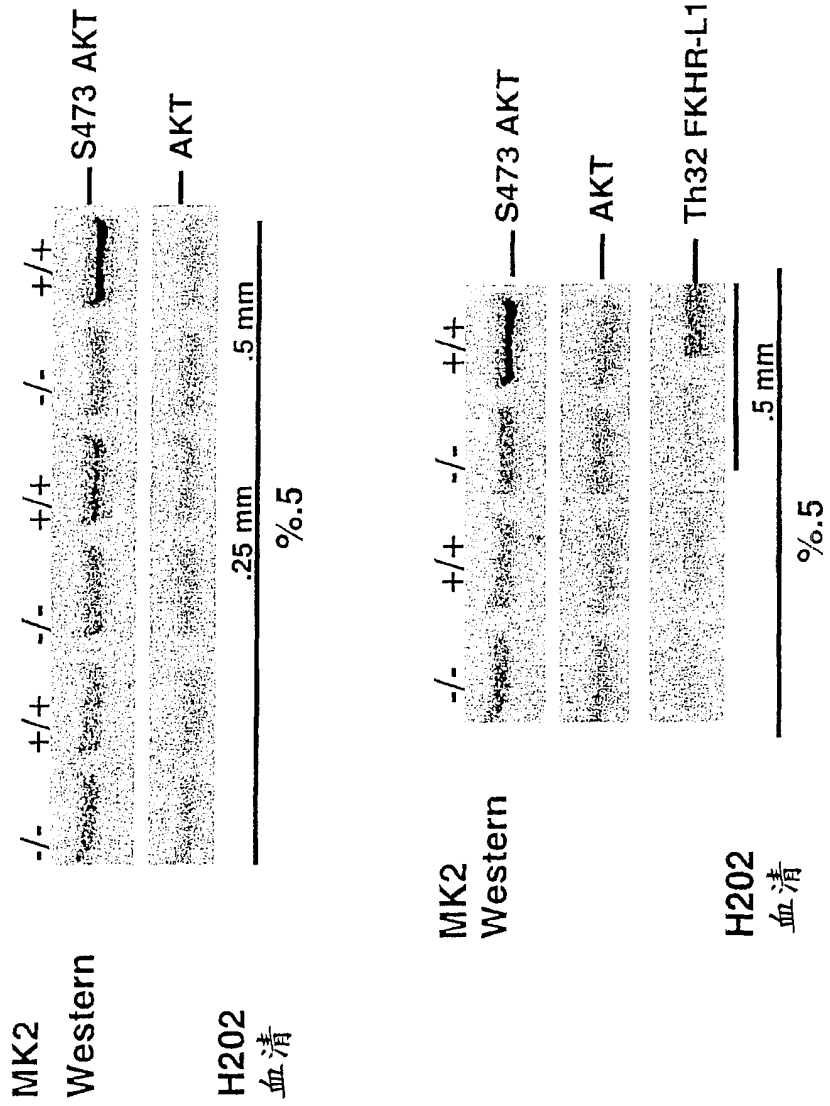


图 17